



Entwicklung, Synthese und biologische Untersuchung verschiedener Gold(I)-Alkin-Komplexe als potenzielle Antitumorwirkstoffe

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades
einer Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
Dissertation

von Agnieszka Varchmin
aus Gdynia (Gdingen) / Polen

1.	Referent:	Prof. Dr. Ingo Ott
2.	Referent:	Prof. Dr. Conrad Kunick
eingereicht am:		10.03.2021
mündliche Prüfung (Disputation) am:		01.07.2021

Druckjahr 2021

Vorveröffentlichung der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Gold Metallodrugs to Target Coronavirus Proteins: Inhibitory Effects on the Spike-ACE2 Interaction and on PLpro Protease Activity by Auranofin and Gold Organometallics (Publikation), Gil-Moles, M., Basu, U., Büssing, R., Hoffmeister, H., Türck, S., Varchmin, A., Ott I., Chemistry - A European Journal (2020) [1]

Tagungsbeiträge

Entwicklung, biologische Untersuchung und Targetidentifizierung von Alkynylgold(I)-Komplexen als potentielle Zytostatika (Vortrag), Prochnicka, A., Ott, I., Projekttreffen - Neuartige Synthese- und Formulierungsverfahren für schwerlösliche Arzneistoffe und empfindliche Biopharmazeutika (SynFoBiA), 2015, Braunschweig

Phosphan-Au(I)-Alkine - Syntheseoptimierung, Formulierungsversuche (Vortrag), Prochnicka, A., Projekttreffen - Neuartige Synthese- und Formulierungsverfahren für schwerlösliche Arzneistoffe und empfindliche Biopharmazeutika (SynFoBiA), 2016, Braunschweig

Cluster 1 - Chemical Synthesis and Downstreaming Processes (Workshopbeitrag) - Agnieszka Prochnicka, Jessica Wölker, Rosanna Meine, Tobias Sauk, Marius Meise, Moritz Rehbein, Victor Emenike, Xiangzhong Xie, Andreas Mecklenfeld, μ -Props, 30.03.2016, St. Andreasberg

Synthese und biologische Untersuchung von neuen Gold(I)-Alkinen als potentielle Zytostatika (Vortrag), Prochnicka, A., Pharmazieseminar WS 16/17, 2017, Braunschweig

Posterbeiträge

Synthesis and Biological Studies of New Alkynylgold(I)-NHC-complexes as Anticancer Agents (Poster), Prochnicka, A., Ott, I., Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), 2014, Frankfurt

Gold(I)-Verbindungen mit NHC- und Alkinliganden als neue Antitumorwirkstoffe (Poster), Prochnicka, A., Ott, I., Projekttreffen - Neuartige Synthese- und Formulierungsverfahren für schwerlösliche Arzneistoffe und empfindliche Biopharmazeutika (SynFoBiA) 2015, Braunschweig

New Alkynyl Gold(I) NHC Complexes Differ in Their NHC Core Show Interesting Anticancer Activity (Poster), Prochnicka, A., Munoz Castro, A., Ott, I., 13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC), 2015, Galway

Gold(I) in Combination with NHC, Phosphane and Alkyne Ligands shows Promising Anticancer Properties - An Overview (Poster), Prochnicka, A., Andermark, V., Kankowski, S., Meyer, A., Rubbiani, R., Göke, K., Bunjes, H., Ott, I., Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), 2015, Düsseldorf

Development of Alkynyl-Gold(I) Complexes as New Anticancer Agents - Synthesis, Chemical Properties and First Biological Evaluation (Poster und Kurzvortrag), Prochnicka, A., Andermark, V., Kankowski, S., Ott, I., Symposium on Pharmaceutical Engineering Research (SPhERe), 2015, Braunschweig

Entwicklung, biologische Untersuchung und Targetidentifizierung von Alkynylgold(I)-Komplexen als potentielle Zytostatika (Poster), Prochnicka, A., Ott, I., Projekttreffen - Neuartige Synthese- und Formulierungsverfahren für schwerlösliche Arzneistoffe und empfindliche Biopharmazeutika (SynFoBiA), 2016, Braunschweig

Gold(I)-Alkynyl Complexes Establish as Possible Anticancer Agents (Poster), Prochnicka, A., Andermark, V., Kankowski, S., Munoz Castro, A., Ott, I., 13th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC), 2016, Budapest

Dla Mamy i Taty

„Es ist nicht alles Gold, was glänzt. Aber es glänzt auch nicht alles, was Gold ist.“
Christian Friedrich Hebbel

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atomabsorptionsspektroskopie
Abb.	Abbildung
ACN	Acetonitril
ADF	<i>Amsterdam Density Functional</i>
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
CDCl ₃	deutertes Chloroform
CHN	Elementaranalyse
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
δ	Chemische Verschiebung, ppm
DC	Dünnschichtchromatographie
DCM	Dichlormethan
DEPT 135	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i> , NMR-Experiment zur Kohlenstoffbestimmung mit einem Impulswinkel von 135 °
DMEM	<i>dulbecco's modifed eagle medium</i> , Zellkulturmedium
DMF	Dimethylformid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure, <i>deoxyribonucleic acid (DNA)</i>
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> , signalverstärkte Chemolumineszenz
EDA	<i>energy decomposition analysis</i> nach Morokuma-Ziegler
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Äq.	Äquivalente
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrosprayionisation

Ethyl	Ethylsubstituenten an NHC-Stickstoffen
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FA	Fluoralkin, 1-Ethynyl-4-fluorbenzol
FB	Fluorbenzimidazol, 5-Fluor-1 <i>H</i> -Benzimidazol
FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum, FBS
g	Gramm bzw. Beschleunigungskraft für Zentrifugen
h	<i>hour</i> , Stunden
HA	Wasserstoffalkin, Ethynylbenzol
HB	Benzimidazol, 1 <i>H</i> -Benzimidazol
HB-Ethyl-Au-TPP	[Triphenylphosphan-(1,3-diethylbenzylimidazol-2-yliden)]gold(I)Iodid, Refi
HCl	Salzsäure
dH ₂ O	Demineralisiertes Wasser
rH ₂ O	Reinstwasser
HR-CS AAS	<i>high resolution continuum source atomic absorption spectroscopy</i> , Hochauflösende Kontinuumstrahler-AAS
HR-CS MAS	<i>high resolution continuum source molecular absorption spectroscopy</i> , Hochauflösende Kontinuumstrahler-MAS
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
HSAB-Konzept	<i>Concept of Hard and Soft Acids and Bases</i> , auch Pearson-Konzept
Hz	Hertz
IC ₅₀	<i>inhibitory concentration</i> , mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
LAF	<i>laminar air flow</i> , laminare Luftströmung
Lsg.	Lösung
VI	

m	Multipllett
M	Molarität, Stoffmengenkonzentration, mol/l
MA	Methoxyalkin, 1-Ethinyl-4-methoxybenzol
MB	Methoxybenzimidazol, 5-Methoxycarbonyl-1 <i>H</i> -Benzimidazol
MAS	Molekülabsorptionsspektroskopie
MeOH	Methanol
Methyl	Methylsubstituent an NHC-Stickstoffen
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar, Stoffmengenkonzentration, mmol/l
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
m/V	Massenkonzentration, Masse pro Volumen
m/m	Konzentration, Masse pro Masse
m/z	Massenzahl
n	Anzahl der Bestimmungen
nM	nanomolar, Stoffmengenkonzentration, nmol/l
N	Normalität ($N=M \cdot \text{Ionenwertigkeit}$)
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADP+	oxidierte Form des NADP
NADPH	reduzierte Form des NADP
NaOH	Natriumhydroxid
n.b.	nicht bestimmt
NHC	<i>N</i> -heterozyklisches Carben
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> , Kernresonanz
OTf	Trifluormethansulfonat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung

ppm	parts per million, Teile von einer Million, chemische Verschiebung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PVZ	Zentrum für Pharmaverfahrenstechnik
q	Quartett
r ²	Korrelationskoeffizient
RCF	<i>relative centrifugal force</i> , Relative Beschleunigungskraft
RM	Reaktionsmix
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute [U/min]
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SCM	<i>Scientific Computing & Modelling</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
sec	<i>second</i> , Sekunden
SP	Schmelz- oder Zersetzungspunkt
Stabw.	Standardabweichung
SynFoBiA	Verbundprojekt – Neuartige Synthese- und Formulierungsverfahren für schwerlösliche Arzneistoffe und empfindliche Biopharmazeutika
t	Triplett
TBS	<i>tris-bufferd saline</i> , Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	<i>tris-bufferd saline with Tween20</i> , Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TEP	Triethylphosphan
TEP-Au-FA	[2-(4-Fluor)ethin-1-yl](triethylphosphan)gold(I)
TEP-Au-mFA	[2-(3-Fluor)ethin-1-yl](triethylphosphan)gold(I)
TEP-Au-oFA	[2-(2-Fluor)ethin-1-yl](triethylphosphan)gold(I)
TEP-Au-HA	(2-Phenylethin-1-yl)(triethylphosphan)gold(I)
TEP-Au-MA	[2-(4-Methoxyphenyl)ethin-1-yl](triethylphosphan)gold(I), Ref3
TEP-Au-mMA	[2-(3-Methoxyphenyl)ethin-1-yl](triethylphosphan)gold(I)
TEP-Au-oMA	[2-(2-Methoxyphenyl)ethin-1-yl](triethylphosphan)gold(I)

THF	Tetrahydrofuran
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TMS	Tetramethylsilan
TNB	2-Nitro-5-thiobenzoat
TPP	Triphenylphosphan
TPP-Au-MA	[2-(4-Methoxyphenyl)ethin-1-yl](triphenylphosphan)gold(I), Ref2
TPP-Au-FA	[2-(4-Fluor)ethin-1-yl](triphenylphosphan)gold(I)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Trometamol, Trizma®
Trx	Thioredoxin
TrxR	Thioredoxinreduktase
U	Units
UV-VIS	ultravioletter bis sichtbarer Wellenlängenbereich des Lichts
ü.N.	über Nacht
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar, Stoffmengenkonzentration, µmol/l
V/V	Konzentration, Volumen pro Volumen
WB	Western Blot
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	„Der König aller Krankheiten“	1
1.2	Bedeutung von Metallkomplexen in der Medizin	9
1.3	Goldkomplexe - eine kurze Übersicht.....	12
2	Ziele der Arbeit und Darstellung der Themenbereiche	23
2.1	NHC-Au(I)-Alkine	24
2.2	Erweiterung der NHC-Au(I)-Alkin-Serie	28
2.3	Phosphan-Au(I)-Alkine	34
3	Berechnung chemischer Eigenschaften der NHC-Au(I)-Alkine.....	37
3.1	Geometrische Parameter.....	38
3.2	Elektrostatische Ladungsverteilung und molekulare Dipolmomente.....	44
3.3	Bindungsdissoziationsenergien.....	46
4	Synthese der Gold(I)-Komplexe	49
4.1	Syntheseoptimierung.....	51
4.2	Syntheseentwicklung für Ligandenaustausch	54
4.3	Chemische Charakterisierung der NHC-Au(I)-Alkine	60
4.4	Phosphan-Au(I)-Alkin-Synthese-Optimierung.....	75
5	Untersuchungen des Potentials als Zytostatika.....	79
5.1	Antiproliferationsuntersuchungen	79
5.2	Morphologische Beobachtungen und Wachstumsuntersuchungen.....	93
5.3	Interaktion mit Zellkulturproteinen	98
5.4	Zellaufnahmestudien	102
5.5	TrxR-Inhibition.....	110
5.6	Untersuchungen am Zelllysate.....	115
6	Phosphan-Au(I)-Alkine: Formulierungsversuche und Vergleich des zytotoxischen Potentials.....	119
6.1	Auswahl der Nanoformulierung	120
6.2	Beladung und Goldgehaltmessung.....	124
6.3	Zytotoxizität.....	128
6.4	Zellaufnahme	128
6.5	Vergleich der biologischen Aktivität der Phosphan-Au(I)-Alkine.....	129
7	Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick	132
7.1	Zusammenfassung und Diskussion.....	132

7.2	Ausblick.....	148
8	Material und Methoden.....	152
8.1	Geräteliste.....	152
8.2	Chemikalien- und Reagenzienliste.....	153
8.3	Lösungen, Puffer und Medien	155
8.4	Humane Zelllinien.....	160
8.5	Synthesevorschriften und Substanzcharakterisierung	161
8.5.1	Ringschluss (a).....	162
8.5.2	Alkylierung (b).....	163
8.5.3	Transmetallierung (c, d).....	167
8.5.4	Ligandenaustausch (e).....	172
8.6	Biologische und bioanalytische Methoden.....	182
8.6.1	Autoklav-Programme.....	182
8.6.2	Gelatinebeschichtung.....	182
8.6.3	Passage.....	182
8.6.4	Viabilitätstest.....	184
8.6.5	Einfrieren.....	184
8.6.6	Auftauen	185
8.6.7	Aussäen.....	185
8.6.8	Zytotoxizitäts- bzw. Antiproliferationstest.....	186
8.6.9	Wachstumsratenbestimmung	188
8.6.10	Scratch-Assay.....	189
8.6.11	Zellaufnahme	189
8.6.12	Proteingehaltsmessung mittels Bradford-Bestimmung.....	190
8.6.13	Proteininteraktion/Proteinbindung.....	191
8.6.14	Quantifizierung des Metallgehalts mittels HR-CS AAS bzw. MAS.....	192
8.6.15	TrxR-Inhibitionstest.....	194
8.6.16	Proteingelelektrophorese.....	195
8.6.17	Western Blot.....	198
8.6.18	Untersuchungen am Zelllysat.....	198
8.6.19	Aktivität von disulfidspaltenden Enzymen	199
8.7	Formulierungsversuche	200
8.7.1	Zytotoxizität der Nanoemulsionen.....	200
8.7.2	Beladung und Goldgehaltbestimmung.....	201
8.7.3	Zytotoxizität der beladene Nanoemulsion	202

8.7.4	Zellaufnahme der beladenen Nanoemulsion.....	202
9	Danksagung	203
10	Literaturverzeichnis.....	205

1 Einleitung

1.1 „Der König aller Krankheiten“

„Krebs beginnt und endet mit dem Menschen. Diese eine elementare Tatsache wird bei aller wissenschaftlicher Abstraktion zuweilen vergessen [...]“ [2] Diese Aussage stammt von June Goodfield, einer Wissenschaftshistorikerin, die in vielen Bereichen der Medizin und Naturwissenschaften tätig ist und sich mit der Ethik dieser Gebiete beschäftigt. Gefunden habe ich das Zitat in dem Buch „Der König aller Krankheiten“ von Siddhartha Mukherjee. Mukherjees Buch ist eine Art Biographie über Krebserkrankungen und den stetigen Kampf der Forscher gegen diese. Krebs ist eine Krankheit, die mittlerweile das Leben aller Menschen betrifft. Wenn man nicht selbst betroffen ist, hat man Verwandte oder Freunde, die an Krebs erkrankt sind. Auch wenn die Diagnose „Krebs“ mittlerweile nicht wie im 19. Jahrhundert einem Todesurteil gleichkommt, verändert sie das Leben der Betroffenen und ihres Umfeldes schlagartig.

Goodfield und Mukherjees sprechen für mich einen besonderen Aspekt der Arbeit der Krebsforschung an. Diese Arbeit, wie auch alle anderen Bereiche der Krebsforschung, beschäftigen sich mit sehr speziellen Fragestellungen. Da gerät leicht in den Hintergrund, dass es schlussendlich um Menschen und deren Lebensqualität geht und ein hoher Handlungsdruck besteht. Als Forscher empfindet man Neugier und auch Freude an seiner Arbeit und nicht selten auch Stolz, wenn ein Versuch interessante Ergebnisse hervorbringt. Manchmal geht dabei sogar der Blick dafür verloren, dass die Arbeit für einen selbst mit gesundheitlichen Gefahren verbunden sein kann. Die Wirkstoffe selbst haben meist ein hohes Gefahrenpotential für gesunde Menschen, aber auch bei der Arbeit mit Lösemitteln oder anderen Chemikalien sind hohe Sicherheitsmaßnahmen erforderlich.

Nichtsdestotrotz ist diese Forschung notwendig und wichtiger denn je. Die Neuerkrankungsraten sind in den letzten Jahrzehnten immer weiter gestiegen. Erst seit einigen Jahren lässt sich eine gebremste Tendenz erkennen, was sicherlich an den neu eingeführten Präventions- und Früherkennungsmaßnahmen liegt. [3, 4] Zudem nimmt die Arbeitssicherheit eine immer größere Rolle in Forschung und Industrie ein, sodass die Exposition mit krebsfördernden Stoffen auf ein Minimum reduziert wird. Das bessere Verständnis von Zytostatika, also Wirkstoffen, die Krebszellen angreifen und abtöten, trägt ebenfalls dazu bei.

Trotz der sich stetig verbessernden medizinischen Versorgung und Prävention nehmen Krebserkrankungen in Deutschland nach den Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems den zweiten Platz unter den häufigsten Todesursachen ein (siehe Abbildung 1). [5, 6]

Das allein ist Grund genug, Medikamente zu entwickeln, die selektiv die Krankheit bekämpfen und so geringe Nebenwirkungen wie möglich haben. Das große Problem und auch das Gefahrenpotential der Zytostatika liegen jedoch in der mangelnden Selektivität. Zum einen sind die Zielstrukturen körpereigene Zellen, zum anderen ist unterschiedlichstes Gewebe des gesamten Körpers betroffen, angefangen bei der Haut, über das Gehirn, Knochen, allen anderen Organen bis hin zu geschlechtsspezifischen Drüsen oder Körperteilen.

Abbildung 2 zeigt die Lokalisation der Neuerkrankungen, wodurch deutlich wird, wie vielfältig das betroffene Gewebe ist. [4] Der Unterschied zwischen Frauen und Männern ist ebenfalls deutlich ausgeprägt. Stark betroffene Gewebearten sind Brustdrüsen, die Prostata, die Lunge und der Darm.

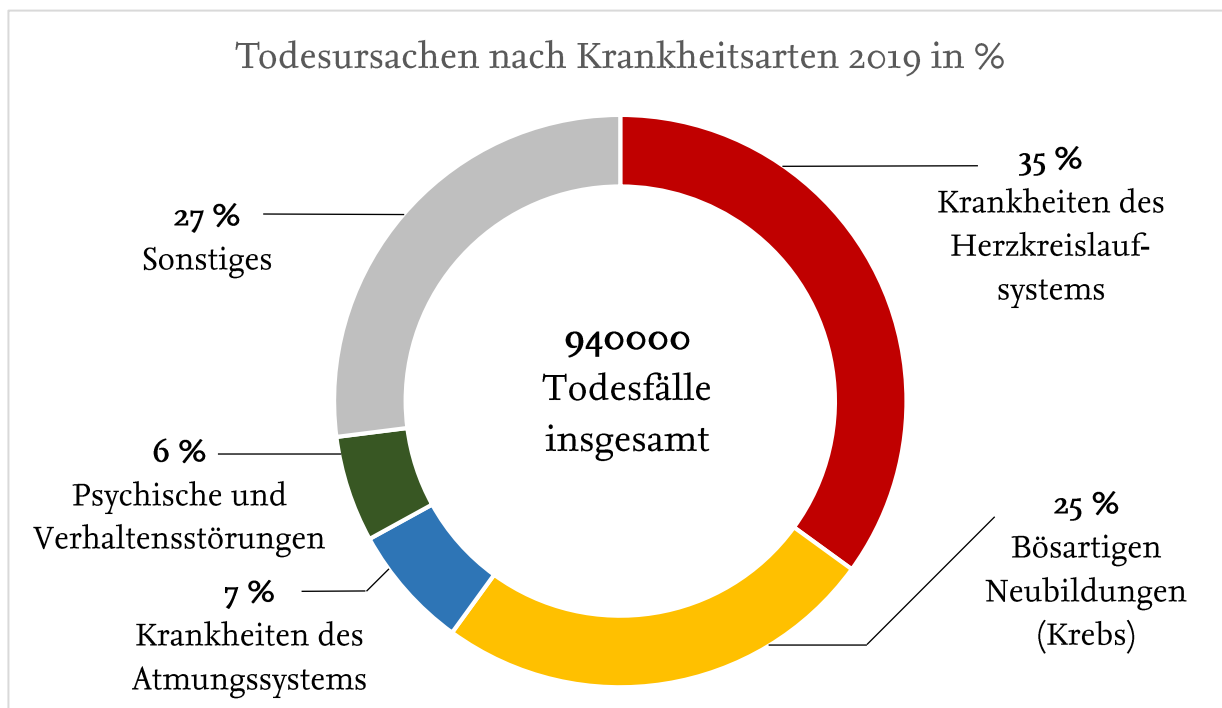
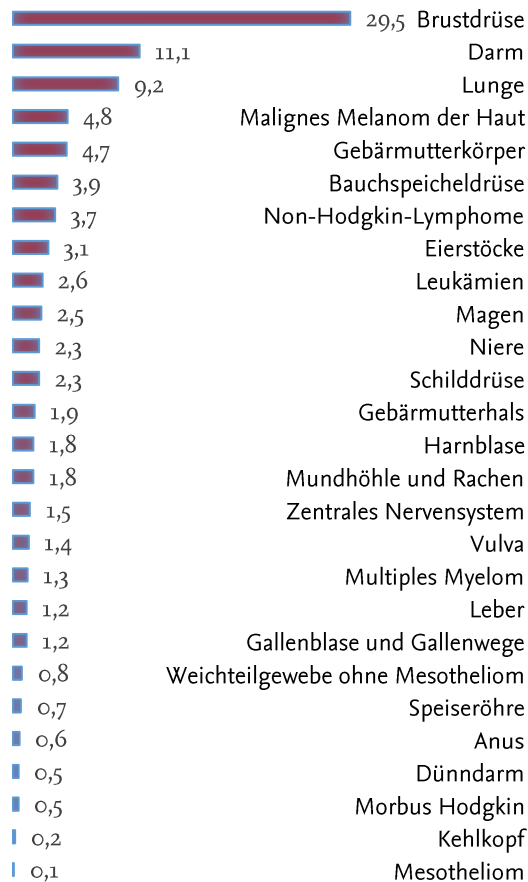


Abbildung 1 Anteil [%] der Krankheitsarten an den Todesursachen in Deutschland in 2019 [5,6]

FRAUEN



MÄNNER

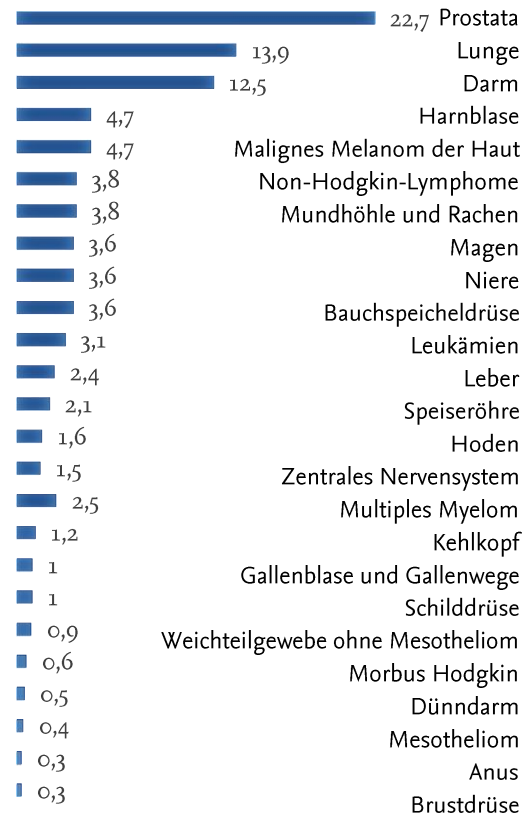


Abbildung 2 Anteil [%] der Tumorlokalisationen an den Neuerkrankungen in Deutschland 2016 für Frauen und Männer [3, 4]

Eine medikamentöse Therapie stößt bei Krebserkrankungen schnell an ihre Grenzen, da körpereigene Zellen die Ursache für die Krankheit sind. Fremdorganismen wie Pilze oder Bakterien sind durch ihren eigenen Aufbau und Stoffwechsel leichter anzugreifen und die Nebenwirkungen auf den menschlichen Körper sind nicht so ausgeprägt. Werden jedoch menschliche Zellen zum Ziel von Wirkstoffen, ist es logisch, dass die Nebenwirkungen deutlich zunehmen und somit eine Therapie komplizierter wird. Die meisten Forscher besitzen zum Glück eine hohe Toleranzgrenze gegenüber Misserfolgen und versuchen immer wieder die Krankheit besser zu verstehen und neue Therapien zu entwickeln.

Um besser zu verstehen, warum Krebs so schwer therapierbar ist, hilft ein Blick auf die Entstehung von Krebszellen. Was passiert mit Zellen, wenn sie zu bösartigen (=malignen) Tumoren ausarten und wo liegen trotz der erschwerten Bedingungen Therapiemöglichkeiten?

Sehr einfach ausgedrückt sind Krebszellen körpereigene Zellen, die nicht mehr richtig funktionieren und somit schädlich für den Organismus sind. Gesunde Zellen durchlaufen einen definierten Lebenszyklus, der sich aus Zellteilung (=Proliferation), Zelldifferenzierung und programmierten Zelltod (=Apoptose) zusammensetzt. Die einzelnen Phasen sind für verschiedene Zelltypen unterschiedlich lang und die Häufigkeit der Proliferation ist ebenfalls gewebespezifisch. Erreicht eine Zelle ein gewisses Alter oder fällt sie in einem der vielen Kontrollpunkte des Zellzyklus auf, wird der programmierte Zelltod eingeleitet. Dieser führt als Schutzprogramm zum Abbau der fehlerhaften Zelle, ohne dass Entzündungsprozesse das Gewebe schädigen. Dem entgegen steht die Nekrose, also das Absterben von Zellen, das durch äußere Noxen wie Gifte, Erreger oder Verletzungen hervorgerufen wird und umliegendes Gewebe durch eine Entzündung schädigen kann.

Krebszellen brechen aus dem normalen Zellzyklus aus, indem sie sich unkontrolliert teilen (=gestörte Proliferation), keine zellspezifischen Funktionen mehr übernehmen (=gestörte Differenzierung) und die Apoptose umgehen. [7]

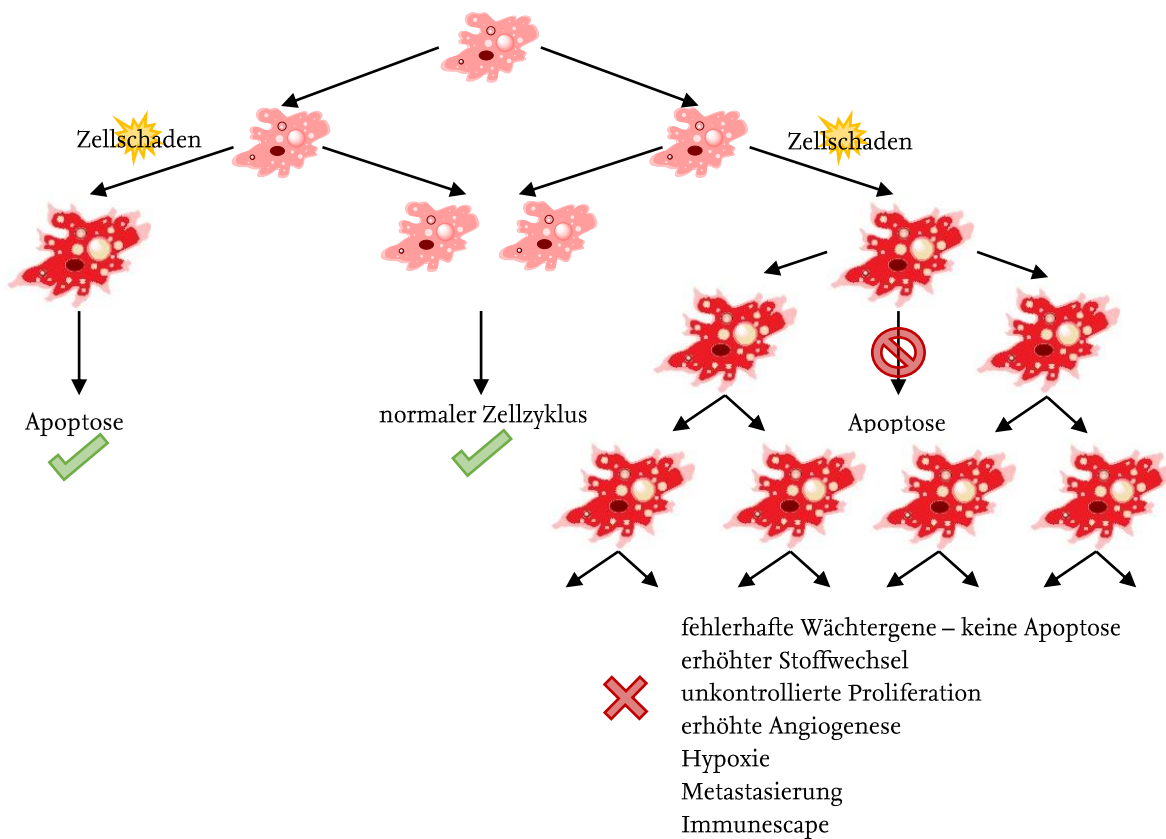


Abbildung 3 Zellteilung und Krebsentstehung

Abbildung 3 fasst den Entstehungsprozess von Krebszellen zusammen. Für die Entartung der Zelle sind mehrere Faktoren nötig. Durch eine Zellschädigung kommt es zu einer Veränderung des Erbmateri als. Die Auslöser für solch eine Veränderung der Desoxyribonukleinsäure (kurz DNS) können zufällige Mutationen oder äußere Noxen, wie Gifte, UV- oder radioaktive Strahlung sowie retrovirale Erkrankungen sein. Funktionieren an dieser Stelle die zelleigenen Kontrollpunkte, wird so eine Zelle in die Apoptose geleitet. Bei Krebszellen sind jedoch diese Kontrolleinheiten, die als Tumorsuppressorgene bezeichnet werden, ausgeschaltet oder fehlerhaft und sogenannte Onkogene, die die Apoptose verhindern, überwiegen. Die betroffene Zelle hat somit eine Fehlfunktion und die Apoptose kann nicht eingeleitet werden. Die fehlerhafte Zelle besitzt einen veränderten Stoffwechsel und teilt sich durch eine erhöhte Proliferationsrate unkontrolliert weiter, sodass die Krebszellzahl schnell zunimmt und das gesunde Gewebe eingeschränkt wird. [8–10] Krebszellen gewinnen die benötigte Energie oft über mehrere Prozesse (Warburg-Effekt). Sie können zudem unter verringertem Sauerstoffbedarf überleben (Hypoxie) und sind in der Lage die Bildung von Blutgefäßen (Angiogenese) anzuregen. Dadurch können sie ihre Nährstoffversorgung verbessern und unter verschiedenen Bedingungen überleben. [11, 12] Eine große Gefahr ist zudem die Fähigkeit zur Metastase. [13] Krebszellen lösen sich dabei aus ihrem Zellverband, verteilen sich im Körper und bilden neue Krebsherde.

Des Weiteren besitzen Krebszellen die Fähigkeit des sogenannten *Immunescape*, also die Möglichkeit sich vor dem Immunsystem zu verstecken. [14] Eigentlich können natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Zellen kranke oder geschädigte Körperzellen erkennen und diese bekämpfen. Dies stellt eine sehr spezifische Reaktion dar, da zwischen gesunden und kranken körpereigenen Zellen unterschieden werden kann. Gegen diesen Schutzmechanismus entwickeln manche Krebszellen aber Gegenmaßnahmen. So können Veränderungen in den Zellen dazu führen, dass die normalen Zellmembranmarker für eine kranke Zelle nicht präsentiert werden und die Krebszelle als gesund angesehen wird. Krebszellen können zudem das Immunsystem in ihrem nahen Umfeld so modulieren, dass es eine verringerte Aktivität aufweist und dadurch eine Art Unterfunktion entsteht.

Es wird deutlich, warum Krebserkrankungen die Forschung und Medizin vor viele Probleme stellen. Die Besonderheit, dass die körpereigenen Schutzmechanismen ausgehebelt werden und

die mangelnde Selektivität von Wirkstoffen und anderen Therapien erschweren eine Heilung erheblich. Wenn möglich, wird auch heutzutage eine lokale Behandlung versucht. So kann erkranktes Gewebe in vielen Fällen operativ entfernt werden. Hinzu kommt die Möglichkeit der lokalen Strahlentherapie. Die meisten Chemotherapeutika werden systemisch angewendet und führen so wegen geringer Selektivität zu Nebenwirkungen. [15, 16] Bei einigen Krebsarten wie der Leukämie kann eine Stammzellentransplantation nötig sein. Zusätzlich werden Hyperthermie und Immuntherapie genutzt, um die Krankheit zu bekämpfen. Welche Therapieform für einen Patienten oder eine Patientin geeignet ist, hängt stark von der Lokalisation, Abgrenzung, Metastasierung des Tumors und personellen Faktoren ab, sodass auch bei gleicher Diagnose manchmal andere Therapievarianten genutzt werden.

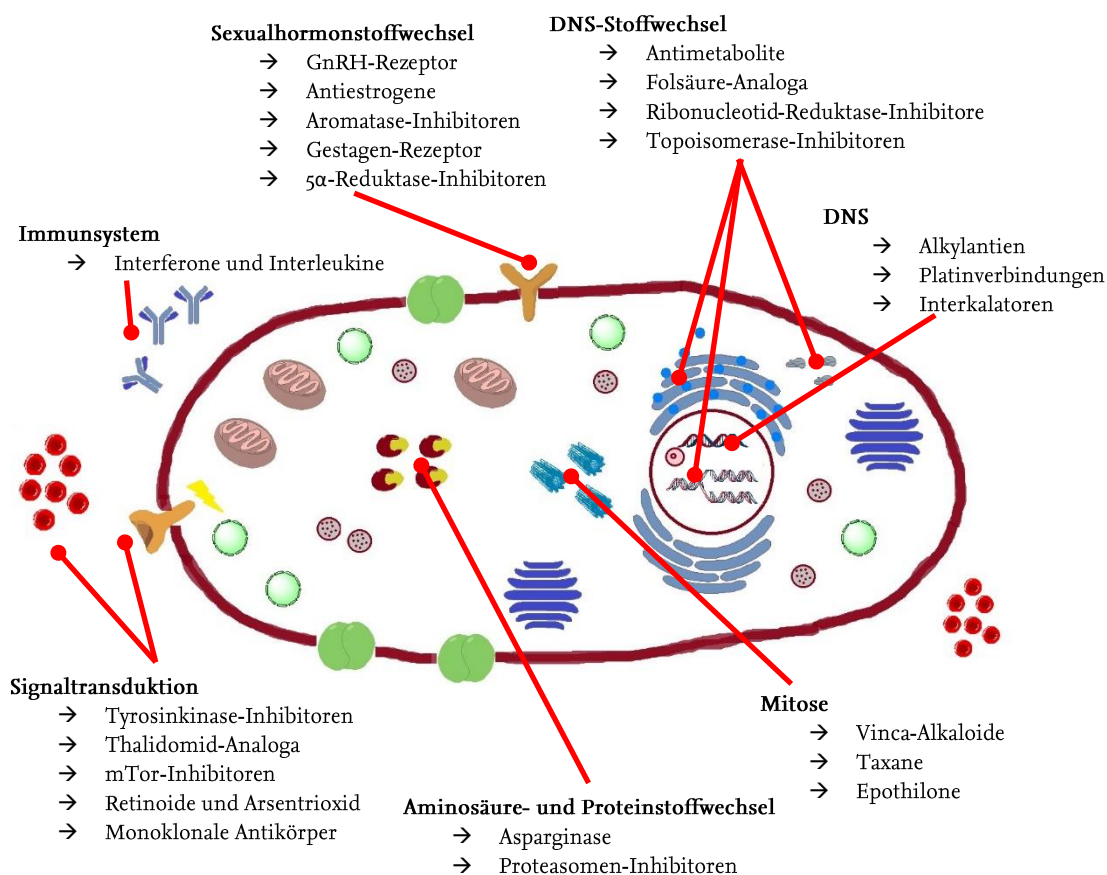


Abbildung 4 Klinisch genutzte Wirkstoffklassen und Zielstrukturen auf Zellebene

Der Einsatz von chemischen Wirkstoffen hat als Endziel das selektive Abtöten der Krebszellen, bevorzugt in Form von Apoptose. Obwohl körpereigene Zellen das Ziel der Wirkstoffe darstellen, gibt es wie erwähnt einige spezifische Eigenschaften, die eine gewisse Selektivität ermöglichen. Der Stoffwechsel, das Wachstum und die Zellteilung sind bei Krebszellen stark erhöht, sodass z.B. die DNS-Synthese ein mögliches Ziel darstellt. Es kommen vielseitige Substanzen mit

verschiedenen Zielstrukturen zum Einsatz und werden auch untereinander kombiniert. Abbildung 4 zeigt Zielstrukturen auf Zellebene der aktuell genutzten Wirkstoffklassen. [7, 15, 16] Viele der verwendeten Wirkstoffe zielen auf die DNS selbst oder ihre Replikation sowie auf den Zellteilungsmechanismus. Alkylantien wie N-LOST-Derivate oder ThioTEPA alkylieren die DNS. Platinverbindungen reagieren direkt mit der DNS. Zu ihren Vertretern zählt das Cisplatin sowie die Weiterentwicklungen Carbo- und Oxaliplatin, die deutlich geringere unerwünschte Arzneimittelwirkungen zeigen. Interkalatoren, zu denen z.B. die Anthracycline zählen, schieben sich zwischen die DNS-Stränge.

Bestimmte zelluläre Signal- und Synthesewege oder spezifisch der Sexualhormonhaushalt können ebenfalls angesteuert werden. Antimetabolite (z.B. 5-Fluoruracil) und Folsäureanaloga wie das Methotrexat beeinflussen den DNS-Stoffwechsel. Mitoseinhibitoren, wie die Vinca-Alkaloide Vinblastin und Vincristin, stören die Zellteilung.

Immunmodulatoren können das körpereigene Abwehrsystem unterstützen, die entarteten Zellen zu erkennen und zu beseitigen. Einige Wirkstoffe kennt man aus der Antibiotikatherapie und ein paar Wirkstoffe sind extrem spezifisch, sodass es keine Alternativen zu diesen gibt. Beispielfhaft kann hier die Asparaginase, ein Enzym, das Asparagin spaltet und Krebszellen dadurch daran verarmen, genannt werden.

An der Vielzahl der Angriffspunkte wird deutlich, dass trotz erschwerter Bedingungen die Wirkstoffentwicklung und das Verstehen der Krankheit voranschreiten.

Nichtsdestotrotz sind die Nebenwirkungen der genutzten Medikamente durch die mangelnde Selektivität immer noch eine extreme Belastung und Gefahr für die Patienten. Zudem kommen Resistenzentwicklungen, die während einer Therapie auftreten können und die Mediziner vor große Probleme stellen.

Hinter den Resistenzen von Krebszellen verbergen sich unzählige Mechanismen, von denen eine große Zahl noch nicht geklärt werden konnte. [17, 18] Mit Untersuchung der Krebsentstehung und der Besonderheiten von Krebszellen werden immer wieder neue Strukturen und Mechanismen entdeckt, die mögliche Angriffsziele für Wirkstoffe darstellen oder eine Resistenz erklären. Diese Forschungsgebiete hängen sehr eng zusammen.

Betrachtet man Resistenzen im Hinblick auf verwendete Wirkstoffe, kann man eine grobe Einteilung treffen. Die Wirkstoffaktivierung kann reduziert sein oder der Wirkstoffabbau oder

Abtransport erhöht. Die Mutation einer Zielstruktur oder deren Unter- oder Überexprimierung können ebenfalls für eine Resistenz verantwortlich sein.

Viele Krebszellen besitzen natürlicherweise Mechanismen wie die P-Glykoproteine, die die Wirksamkeit reduzieren. Zudem führt die genetische Instabilität der meisten Krebszellen zu einer hohen genetischen Variabilität. Eine Krebszellpopulation besitzt somit einen durchaus inkonsistenten Genpool und dadurch eine große Chance, Mutanten zu beinhalten, die einen Selektionsvorteil gegenüber einem Wirkstoff besitzen. [19]

Die Strukturen, die an der Resistenz beteiligt sind, unterscheiden sich je nach Krebsart und sogar je nach Patient, sodass jede Therapie einer individuellen Anpassung unterliegt.

Bei der Gabe von Capecitabin (5-Fluoruracil-Produg, Xeloda®), einem Antimetaboliten, treten zum Beispiel oft Resistenzen auf. Diese können aufgehoben werden, wenn die DNS-Methyltransferase durch einen zusätzlichen Inhibitor blockiert wird. Einen DNS-Methyltransferase-Inhibitor darf man jedoch nicht bei einer Therapie mit Topoisomerase-I-Inhibitoren wie Topotecan geben, da der Methylierungszustand der DNS die Aktivität der Topoisomerase beeinflusst. [7]

Eine Gruppe von Patientinnen, die eine Mutation des BRCA-Gens aufweisen, kann mit PARP-1-Inhibitoren behandelt werden. BRCA steht für *BReast CAncer* und beschreibt zwei Tumorsuppressorgene bzw. ihre Produkte, die bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen eine Rolle spielen. Eine Mutation in diesen Genen erhöht das Krebsrisiko und betroffene Zellen weichen auf alternative Reparaturmechanismen aus. Die Poly(ADP-ribose)Polymerase 1 (kurz PARP-1) stellt ein solches Reparaturenzym dar. Patientinnen mit mutiertem BRCA-Gen sprechen deshalb auf eine Inhibition der PARP-1 als Erhaltungstherapie an. [7] Der erste zugelassene Wirkstoff war 2015 Olaparib (Lynparza von AstraZeneca).

An diesen zwei Beispielen wird deutlich, wie komplex die Resistenzmechanismen sind und wie sich verschiedene Wirkstoffe oder persönliche Prädisposition beeinflussen. Deshalb wird eine medikamentöse Krebstherapie mittlerweile fast immer als Polychemotherapie angesetzt. Diese Komplexität führt auch zu einer hohen Nachfrage nach verschiedenen Wirkstoffklassen und einer größeren Anzahl an Vertretern, um die Resistenzen durchbrechen zu können.

1.2 Bedeutung von Metallkomplexen in der Medizin

Vielen sind Metalle eher als Werkstoff wie Stahl oder Gusseisen bekannt. Sie werden als elektrische Leiter verwendet, sind Bestandteile von Elektroden, Lampen oder Thermometern und werden als Legierung genutzt. Sie sind aber auch Schmuck oder Wertanlage. In der Synthese sind sie essentiell für viele Katalysereaktionen. So sind zum Beispiel die Grubbs-Katalysatoren Ruthenium-Komplexe, die Phosphane oder *N*-heterozyklische Carbene (kurz NHC) als Liganden enthalten. Diese Metall-Liganden-Kombination zeigt auch antiproliferative Effekte und spannt eine Brücke zwischen Chemie und Medizin. [20]

In biologischen Systemen kommen Metalle als Zentralatome oder Cofaktoren von Enzymen vor und viele gehören zu den essentiellen Spurenelementen. Eisen, Kupfer, Molybdän, Kobalt, Zink, Mangan, Chrom, Jod, Zinn, Selen und Vanadium zählen zu den lebensnotwendigen Spurenelementen, wovon die meisten Metalle darstellen. [21] So ist z.B. auch die Substitutionstherapie medizinischer Alltag und Eisen, Zink, Magnesium u.v.m. werden bei Mangelerkrankungen als frei zugängliche Nahrungsergänzungsmittel angeboten. Die Metalle Eisen, Kupfer, Zink und Mangan stellen die häufigsten Zentralatome verschiedener Enzyme und leisten die für Stoffwechselprozesse essentielle katalytische Arbeit in allen Organismen. Eisen ist Bestandteil der Häm-Gruppe und somit essentiell für den Transport von Sauerstoff im Blut, zudem enthalten Cytochrome oder Peroxidasen Eisen zur Katalyse. Kupfer lässt sich in vielen Oxidoreduktasen finden, von denen die an der Melaninproduktion beteiligte Tyrosinase oder Monoaminoxidasen bekannte Vertreter sind. Inhibitoren der Monoaminoxidasen werden für die Therapie von Depression und Parkinson verwendet, um den Abbau der Transmitter Serotonin und Dopamin zu reduzieren. So kann der Transmittermangel dieser Krankheiten ausgeglichen werden. Zink ist in nahezu jeder Enzymklasse zu finden und hat Einfluss auf Haut, Wundheilung, Immunsystem, Wachstum und Potenz. Diese greifbaren Auswirkungen eines Zinkmangels erklären auch die häufige Substitution in der Selbstmedikation. Zink ist außerdem Bestandteil der Alkoholdehydrogenase, der Zink-Finger-Proteine und beteiligt an der Insulinspeicherung. [22]

Dies ist nur ein kurzer Auszug aus der Biochemie und Physiologie der Metalle. Es wird aber deutlich, dass Metalle ein großes Potential haben, mit Enzymen zu interagieren. Ein Metallaustausch kann so zum Beispiel zu einem Wirkverlust des betroffenen Enzyms führen. Solche Überlegungen spielen bei der Suche nach potentiellen Wirkstoffen eine immer größer

werdende Rolle und sind mit steigendem Verständnis der biochemischen Mechanismen zielgerichteter.

Metalle besitzen eine elektrische Leitfähigkeit, eine Wärmeleitfähigkeit, sind verformbar und weisen einen typischen metallischen Glanz auf. Diese Eigenschaften gehen auf die metallische Bindung zurück. Im Metallgitter können sich die Elektronen frei bewegen, wodurch sie auch als delokalisiert bezeichnet werden. [23–25] Diese Art der Bindung kommt in reinen Metallen oder in Metallgemischen vor, die Legierungen ergeben. Metalle können zudem als anorganische oder organische Salze vorkommen, werden durch koordinative Bindungen komplexiert oder sie bilden sogenannte metallorganische oder organometallische Bindungen. Die organometallische Bindung entsteht direkt zwischen Metall und Kohlenstoff und kann als polare kovalente Bindung bezeichnet werden. Die metallorganische Chemie ist für die Wirkstoffentwicklung essentiell, da die meisten Liganden organische Strukturen darstellen und die Löslichkeit, Aufnahme und Wirkung der Metallionen beeinflussen. [26, 27]

In allen medizinischen Bereichen sind Metallsalze, koordinativ gebundene Metalle oder organometallische Verbindungen mittlerweile angekommen, jedoch ist das Potential noch lange nicht ausgeschöpft. Anorganische und organische Metallverbindungen besitzen eine immense strukturelle Vielfalt. Die unterschiedlichen Oxidationsstufen und Geometrien, die verschiedenen Liganden sowie ihre unterschiedlichen Kombinationen ermöglichen die Herstellung einer großen Zahl potentieller Wirkstoffe.

Abbildung 5 zeigt einige Metallkomplexe, die klinisch genutzt werden oder sich in klinischen Studien befinden. Die strukturelle Vielfalt sowie die vielen Einsatzgebiete werden schon bei dieser kleinen Auswahl deutlich. [28]

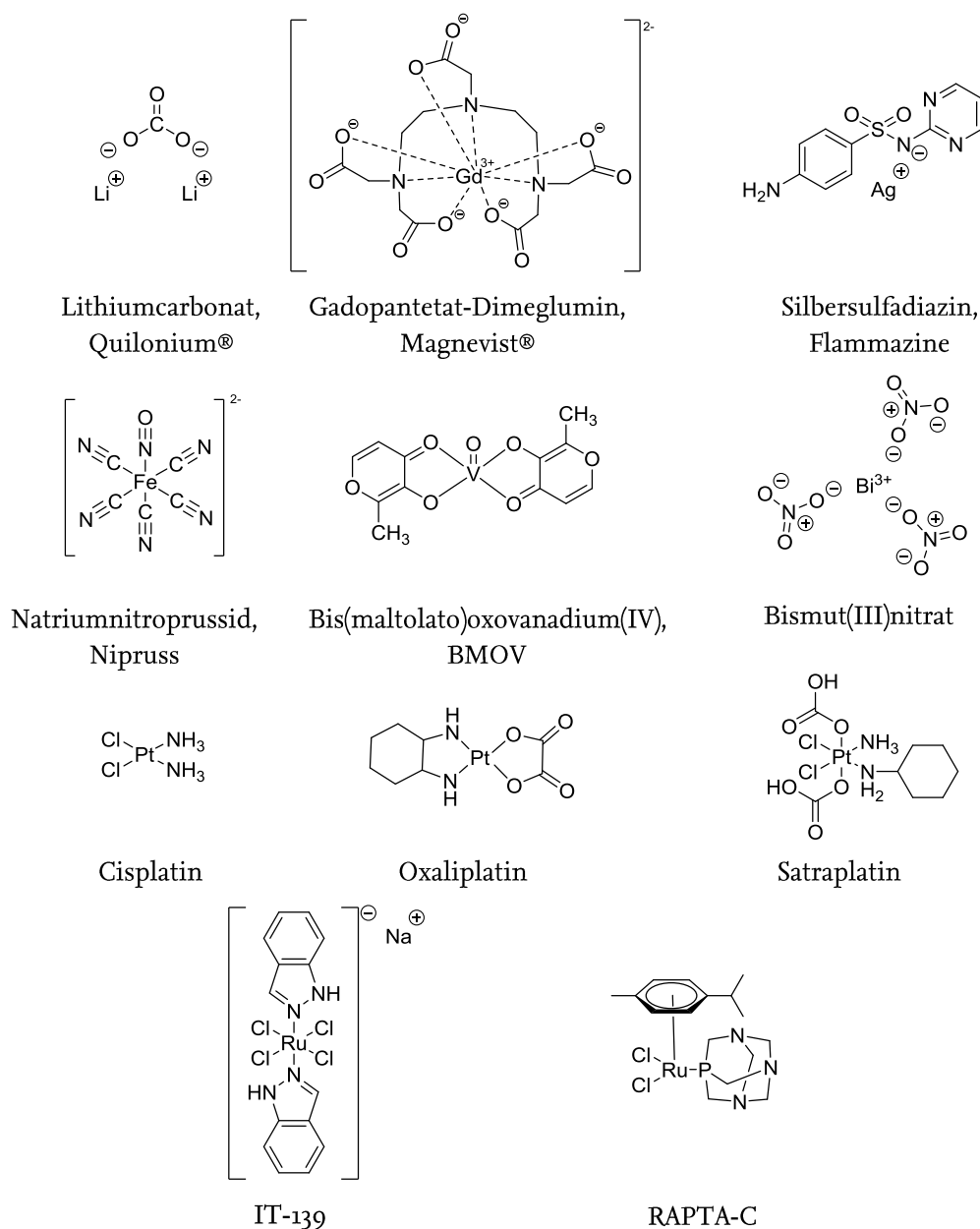


Abbildung 5 Verschiedene klinisch genutzte oder in klinischen Studien befindliche Metallkomplexe [28 - 33]

Das Antidepressivum Lithiumcarbonat (Hypnorex und Quilonium) ist vielleicht in der Bevölkerung einer der meist bekanntesten Metallwirkstoffe und die bereits erwähnte Substitution von essentiellen Metallen mit Nahrungsergänzungsmitteln ist gängige Praxis in der Selbstmedikation.

In der medizinischen Bildgebung werden z.B. Gadoliniumverbindungen als Kontrastmittel in der Kernspintomographie eingesetzt. Neue Untersuchungen ziehen Fe^{3+} und Mn^{2+} als potentielle, leicht zugängliche Metalle für die Kontrastmittelherstellung in Betracht. [29] Silberverbindungen besitzen bei topischer Anwendung sehr gute antibiotische Eigenschaften, sodass Verbindungen wie Silbersulfadiazin bei Verbrennungen oder großen Wunden eingesetzt

werden. Natriumnitroprussid, eine Eisenverbindung, wird bei akutem hohem Blutdruck in der Notfallmedizin eingesetzt. Einige Vanadiumverbindungen wie das BMOV kommen für die Diabetestherapie infrage. Es gibt etablierte metallhaltige Wirkstoffvertreter, wie das Auranofin, in der Rheumatherapie. Bismutsalze wie Bismutnitrat werden bei Ulkus oder der Quadrupeltherapie bei hartnäckigen *Helicobacter pylori* Infektionen verwendet.

Im vorherigen Abschnitt wurden Platinverbindungen bereits als genutzte Metallwirkstoffe in der Krebstherapie erwähnt, wobei Cisplatin den Vorreiter auf diesem Gebiet darstellt. Die hohen Nebenwirkungen führten zu einem Weiterentwicklungsdruck des Wirkstoffs, wodurch Substanzen wie das ebenfalls gezeigte Oxaliplatin oder das Satraplatin, das ein Prodrug mit der Oxidationsstufe IV darstellt, entstanden sind. In der Krebstherapie werden aktuell verschiedene Kombinationen von Metallen und Liganden erprobt. Immer mehr Metalle wie z.B. Titan, Ruthenium und Gold (siehe Kapitel 1.3) rücken dabei neben Platin in den Fokus. [30–32] An den Rutheniumkomplexen IT-139 und RAPTA-C aus Abbildung 5 erkennt man die strukturelle Varianz, die unterschiedliche Oxidationsstufen und Geometrien eines einzelnen Metalls ermöglichen. [33]

Es wird deutlich, dass in vielen Bereichen der Medizin Metalle mittlerweile ein fester Bestandteil sind. Durch die bereits erwähnte Vielseitigkeit der Verbindungen ergibt sich ein riesiges Forschungsgebiet, das Diagnostik, Wirkstoffentwicklung und Grundlagenforschung zum Verständnis von Stoffwechsel- oder Krankheitsmechanismen umfasst.

1.3 Goldkomplexe - eine kurze Übersicht

Das Interesse oder die Faszination für Gold ist sicherlich in dem hohen Wert des Elements, seiner Seltenheit und der starken Symbolkraft begründet. Gold, Silber und Kupfer stellen als gemeinsame Gruppe im Periodensystem auch die sogenannten Münzmetalle dar. Während der Alchemistenära im Mittelalter gab es viele Mythen und Legenden und eines der großen Ziele war es, das wertvolle Gold im Labor aus anderen Elementen mittels Transformation herzustellen. Medizin, die Gold enthielt, wurde als eine Art Jungbrunnen angesehen, sie sollte zudem gegen verschiedene Infektionskrankheiten wie Syphilis oder Malaria helfen, geistige Verwirrung heilen und sogar vor Giften schützen. [34]

Heutzutage wird das meiste Gold als Wertanlage und Schmuck gehandelt. In der Elektronik wird Gold wegen seiner guten Duktilität als Kontaktmaterial verwendet und in der Optik kommt es aufgrund seiner guten Absorption im mittleren Infrarotbereich als Hitzeschutz in der Lasertechnik zum Einsatz. Goldnanopartikel oder Folien werden durch ihre Inertheit immer mehr als Trägerstoffe für zum Beispiel Antikörper in der Analytik verwendet. In der Zahntechnik kommen Goldprothesen in einigen Ländern auch heutzutage noch vor.

Das oral zugängliche Auranofin (Ridaura®) und intramuskulär verabreichte Natriumaurothiomalat (Myocrisin, Tauredon®) sind zwei der derzeit zugelassenen Goldwirkstoffe bei chronischer Polyarthrit, wenn die Therapie mit z.B. Methotrexat nicht anschlägt (siehe Abbildung 6).

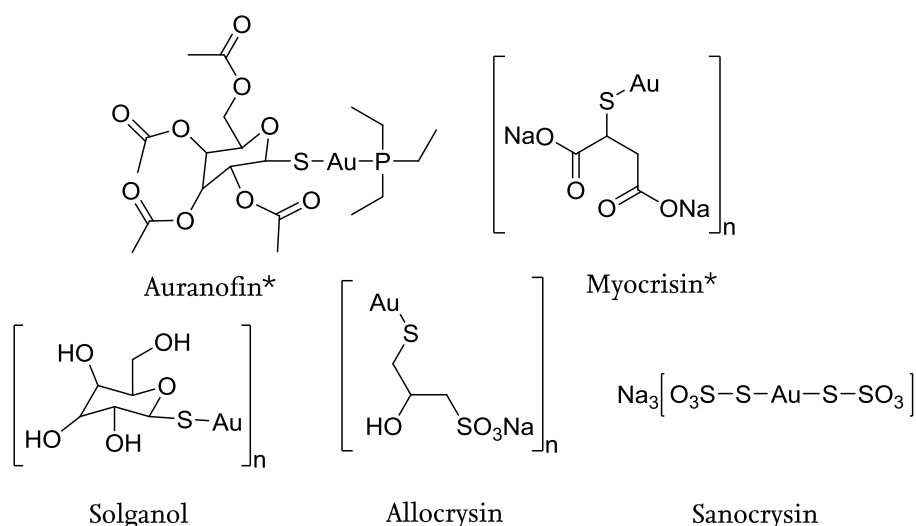


Abbildung 6 Antirheumatika mit Gold(I) als Zentralatom und aktiver* oder ausgelaufener Zulassung [37]

Während weiteren Untersuchungen zu Auranofin ist der gute antiproliferative Effekt auf Krebszellen beobachtet worden und Goldverbindungen gerieten als potentielle Kandidaten für die Krebstherapie in das Blickfeld der Forschung. [35–37]

Gold gehört wegen seiner Beständigkeit im elementaren Zustand zu den Edelmetallen und findet sich unter den Übergangsmetallen. Gold kommt hauptsächlich elementar und in den Oxidationsstufen +1 und +3 vor. Gold(I) und Gold(III) sind in ihrer Stabilität stark von ihren Bindungspartnern abhängig, wobei Gold(III) vor allem unter physiologischen Bedingungen deutlich schneller zu Gold(I) oder elementarem Gold reduziert als Gold(I). [38–40] Dieses

Verhalten erklärt auch, warum Gold(III) in Kombination mit wenig stabilisierenden Liganden als Prodrug für Gold(I) angesehen wird.

Gold(I) besitzt hauptsächlich eine lineare Geometrie und wird zweifach koordiniert. Gold(III) hingegen bildet quadratisch planare Komplexe und ähnelt dadurch Pt(II) (siehe Abbildung 7). [41–43] Darauf basierte die Idee, dass die DNS auch für Gold(III) eine mögliche Zielstruktur darstellt. Die Affinität von Gold(III) zu genomischer DNS ist jedoch deutlich geringer als die von Pt(II) und die Bindung ist reversibel, sodass ein Wirkprinzip allein über DNS-Interaktion für die Gruppe unwahrscheinlich ist. [41, 44–46]

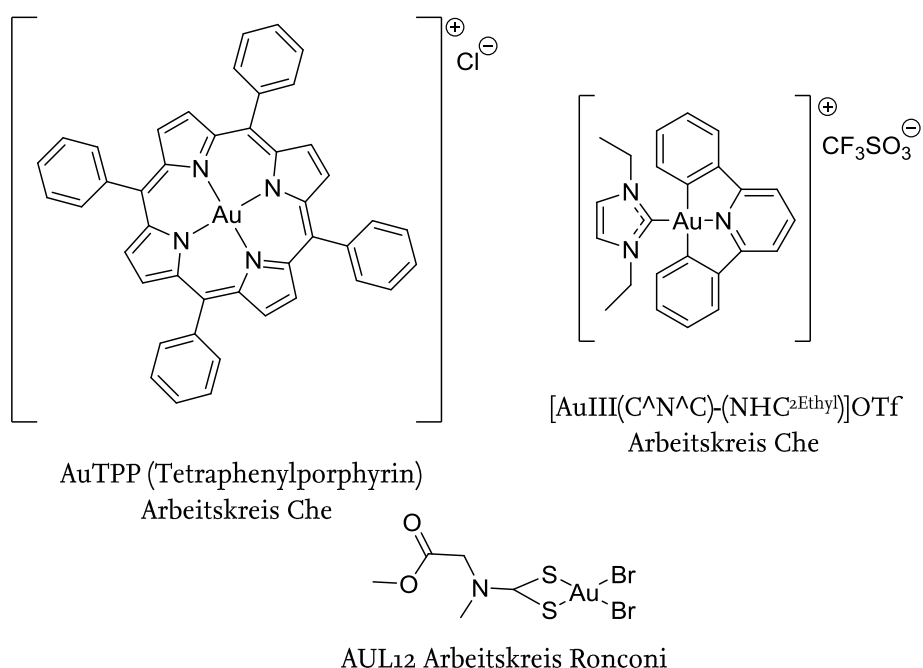


Abbildung 7 Gold(III)-Komplexe der Arbeitsgruppen Che und Ronconi [41 - 44]

Trotzdem zeigen viele Goldverbindungen eine deutliche Hemmung des Zellwachstums. Mittlerweile versteht man durch die Synthese verschiedener Goldkomplexe und deren analytische und biologische Untersuchungen besser, wie die Aktivität dieser Wirkstoffgruppe erklärt werden kann. Dabei ist die Bedeutung der Liganden sehr hoch anzusetzen.

Aktuell sind bereits viele Kombinationen von Gold in beiden Oxidationsstufen und mit verschiedenen Liganden hergestellt und untersucht worden. [47–49]

Um Stabilität und Reaktivität leichter einschätzen zu können, hilft es, das HSAB-Konzept nach Pearson in die Überlegungen einzubeziehen. Anders als bei der Zuordnung nach Brønsted, die auf Protonenaustausch basiert, werden Substanzen nach ihrer Ladungsdichte eingeteilt und die Unterteilung findet in harte und weiche Säuren und Basen statt (*Hard and Soft Acids and Bases* = HSAB). [50] Harte Säuren und Basen besitzen eine hohe Ladungsdichte, das heißt, dass viele Elektronen auf einen kleinen Atom- oder Molekülradius verteilt sind. Weiche Säuren und Basen haben dementsprechend eine geringe Ladungsdichte. Das HSAB-Konzept fügt sich in das Prinzip der Lewis-Säuren und -Basen ein, das Säuren als Elektronenpaarakzeptoren und Basen als Donatoren beschreibt.

Gold ist eine weiche Lewis-Säure, sodass Liganden, die als weiche Basen fungieren, ideale Partner darstellen. Schwefel und Selen gehören zu den weichen Basen, was die hohe Affinität von Gold zu den beiden Atomen erklärt. Thiol- oder selenolhaltige Zielstrukturen wie die Thioredoxinreduktase, die eine wichtige Rolle im Abbau von oxidativem Stress in der Zelle übernimmt, sind deshalb potentielle Interaktionsstellen für Goldkomplexe. Die Affinität zu Albumin ist ebenfalls durch die Bindung zu Cystein zu erklären. Diese Wechselwirkung ist je nach Applikationsart für die Bioverteilung wichtig.

Zu der Gruppe der weichen Basen zählen ebenfalls Phosphane, die als Teilstruktur im Auranofin enthalten sind, oder die bereits kurz erwähnten NHCs. Beide Liganden bilden stabile Verbindungen mit Gold(I). Des Weiteren wurden auch Halogenide, verschiedene Heteroaromaten, Alkine und schwefelhaltige Strukturen als potentielle Liganden erprobt (siehe Abbildung 8). [51–65]

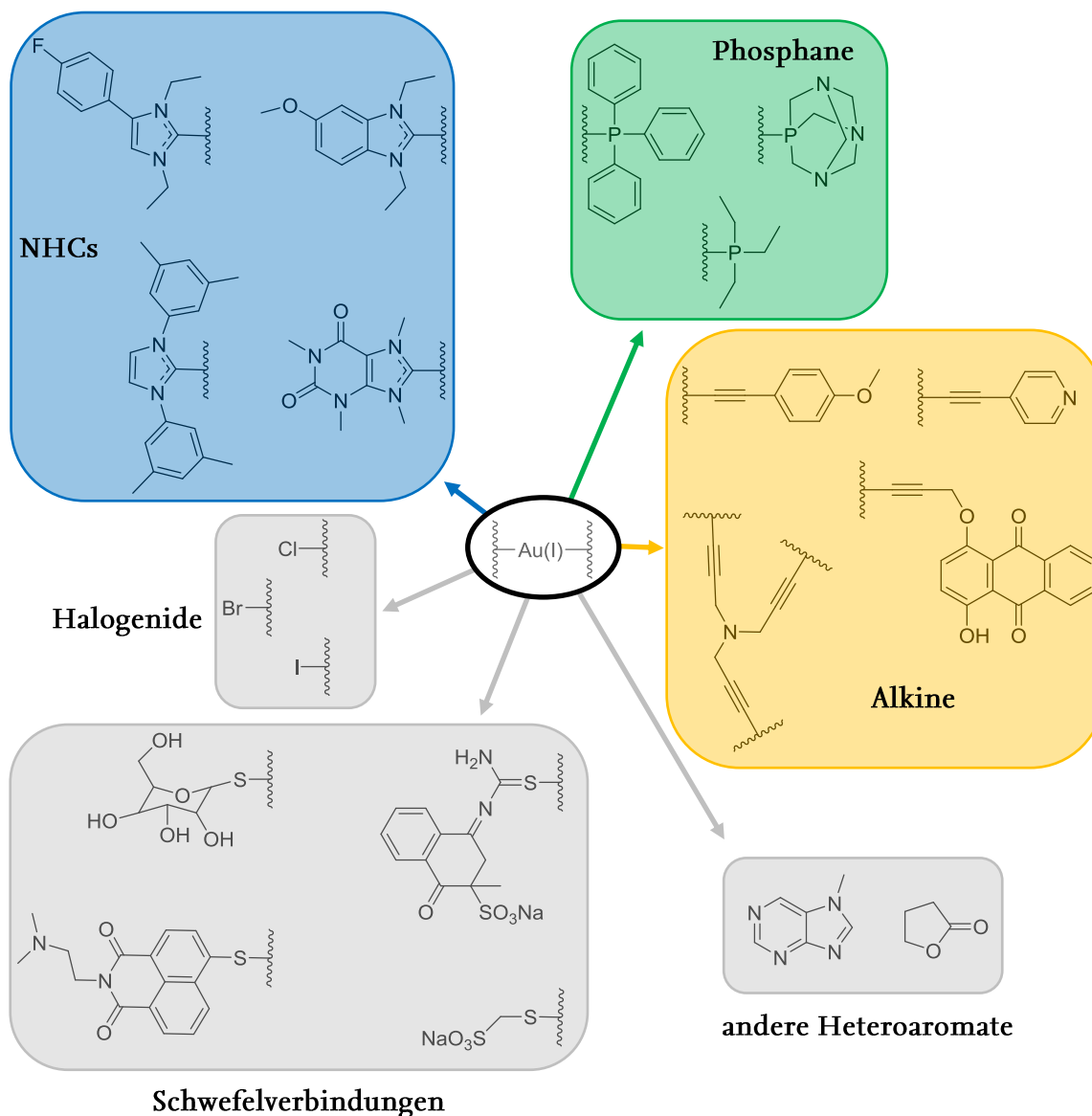


Abbildung 8 Beispiele für mögliche Liganden für Gold(I)

Je nach Ligandenkombination können neutrale oder geladene Komplexe entstehen. Eine Ladung bestimmt neben der Größe und Lipophilie die Löslichkeit und Bioverteilung eines Komplexes erheblich, sodass für geladene und neutrale Goldkomplexe unterschiedliche Zielstrukturen möglich sind. An die beschriebenen Liganden können je nach Synthesemöglichkeiten verschiedenste Strukturen gekoppelt werden und die Kombination der Liganden ist ebenfalls vielseitig möglich (siehe Abbildung 9). [66–78] Das abgebildete GoPi (*gold-phosphole inhibitor*) ist neben Auranofin eine der Leitstrukturen für Goldkomplexe. Es zeigt sehr gute antiproliferative Eigenschaften und ist Ausgangssubstanz vieler Strukturentwicklungen. [55]

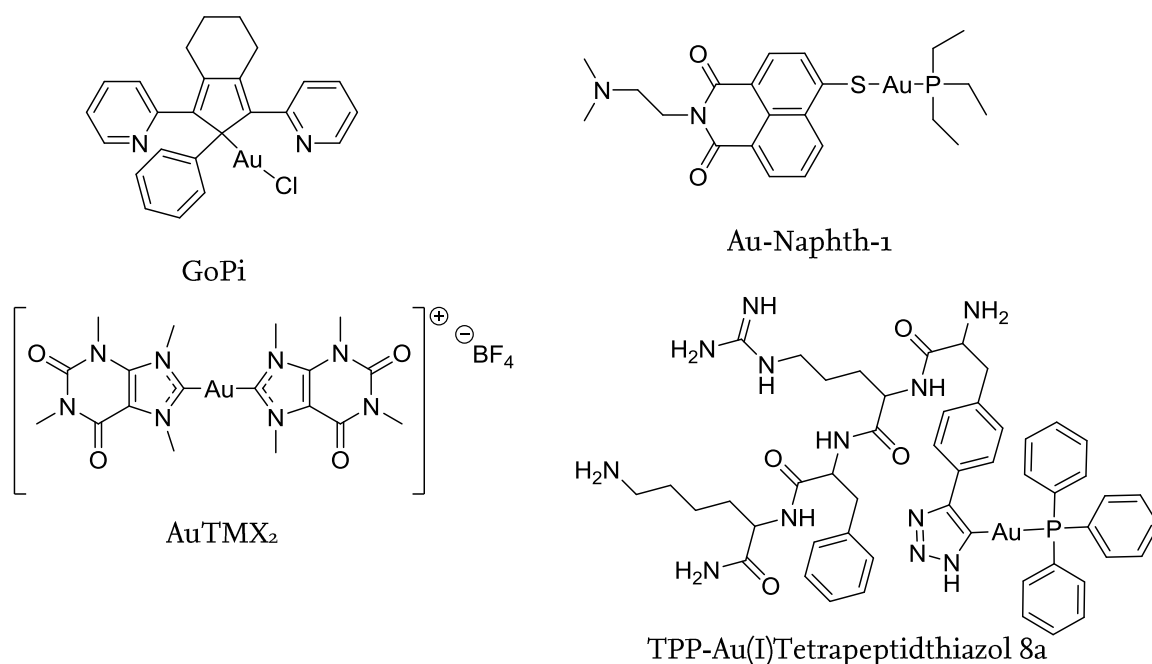


Abbildung 9 Beispiele für Ligandenkombinationen mit Gold(I) als Metallkern [37, 53, 70, 72, 73, 74]

Die Einführung von Strukturen, die selbst einen antiproliferativen Effekt zeigen, wie zum Beispiel die Interkalation durch Naphthalimide, ist ebenfalls möglich. Eine Beispielstruktur wäre Amonafid, das 2010 in den Vereinigten Staaten von Amerika in Phase 3 Studien aufgenommen wurde und bei akuter myeloischer Leukämie getestet wird. [30, 70] Die Kopplung an Peptide oder andere biologische Strukturen kann einen gezielten Transport zum Wirkort ermöglichen. [79] Solche Wirkstoffkandidaten besitzen dann nicht nur einen antiproliferativen Effekt, sondern können konkrete Zellen, Transporter oder Enzyme ansteuern und verringern so mögliche unerwünschte Arzneimittelwirkungen. Für die vorliegende Arbeit sind Phosphane, NHCs und Alkine von großer Bedeutung. Die Projektziele und ihre Entstehung werden in Kapitel 2 erklärt.

Die Kombination der Liganden mit Gold(I) oder Gold(III) als Zentralatom führt, wie bereits hervorgehoben, zu verschiedenen Eigenschaften der Komplexe. Oxidationsstufe, Ladung, Lipophilie, Elektronenverteilung, Größe und räumliche Ausdehnung der Komplexe haben einen wichtigen Einfluss auf die Löslichkeit und Aktivität der Komplexe.

Für Gold(I)-Komplexe wurde mittlerweile je nach Ligandenkombination eine große Anzahl an Zielstrukturen erschlossen, mit denen sie interagieren. [80–82] Diese sind in Tabelle 1 vereinfacht zusammengefasst.

Zielstruktur	Mechanismus	Ergebnis	Beispielliganden
DNS	Bindung	DNS-Schäden	Porphyrine, NHCs, Dithiocarbamate
TrxR	Inhibition	ROS-Zunahme	Phosphane, NHCs uvm.
PARP	Inhibition	Störung DNS-Haushalt	Phosphane, Bipyridyle
Procaspase-3 und 9	Abbau	Caspasekaskade- Induzierung	Phosphane, Bipyridyle, NHCs
Ribonuklease	Inhibition	Störung DNS-Haushalt	Bipyridyle
Proteasom	Inhibition	Störung Enzymhaushalt	Dithiocarbamate
Mitochondrien	Akkumulation/TrxR- Inhibition	Caspasekaskade- Induzierung	Phosphane, NHCs

Tabelle 1 Zielstrukturen von Goldkomplexen und der Einfluss auf den Zellstoffwechsel

Die identifizierten Zielstrukturen sind entweder an der Synthese oder Reparatur von DNS beteiligt oder ihre Aktivierung oder Inhibition führt in der Zelle zu Aktivierung der Caspasekaskade, die die Apoptose einleitet. [83, 84]

Die Inhibition der zytosolischen oder mitochondrialen TrxR sowie des Proteasoms führen allgemein zum Anstieg von Sauerstoffradikalen (=reactive oxygen species, ROS) in den Zellen, was ebenfalls die Apoptose einleitet. [85, 86] Die Thioredoxinreduktase kristallisiert sich für Gold-Verbindungen immer mehr als gute Zielstruktur heraus und wird in Kapitel 5,5 deshalb genauer betrachtet. [87–89]

Wie bereits erwähnt bildet Gold(I) mit Phosphanen und NHCs sehr stabile Komplexe, wodurch diese beiden Gruppen auf großes Interesse stoßen. Die Stabilität basiert darauf, dass die Liganden als weiche Base agieren und Gold(I) als weiche Säure eine hohe Affinität dazu zeigt.

Basierend auf Auranofin und GoPi stellen Phosphane eine interessante und die mittlerweile meist erforschte Ligandengruppe für Gold(I). [37, 55, 90, 91] Sie bilden stabile Verbindungen mit Gold und die Mehrheit der Komplexe lässt sich mit einer guten Ausbeute und Reinheit gewinnen.

Verschiedene Forschergruppen konnten zeigen, dass Phosphan-Au(I)-Komplexe antiproliferativ wirken, Apoptose induzieren können, die Angiogenese reduzieren und verschiedene krebsrelevante Enzyme wie die TrxR oder PARP-1 inhibieren. [60, 92, 93] Phosphane liegen tetraedrisch vor und besitzen ein freies Elektronenpaar, wodurch sie sterisch betrachtet eher

sperrige Liganden darstellen. Die Reste des Phosphans sind deshalb von großer Bedeutung für die Eigenschaften als Ligand.

NHCs sind im Vergleich zu Phosphanen strukturell deutlich einfacher zu verändern und bieten deshalb eine große Anzahl an Liganden, deren Eigenschaften man in viele Richtungen steuern kann. Sie sind ähnlich elektronenreich wie Phosphane und zeigen höhere Bindungsdissoziationsenergien mit Metallen, was sie zu stabileren Liganden für diese macht. [94, 95] Heutzutage ist durch die hohe Nachfrage für die Katalyse eine Vielzahl an Möglichkeiten der NHC-Herstellung bekannt und die elektronischen und sterischen Eigenschaften können verschiedenen Fragestellungen angepasst werden. [94, 96]

NHCs stellen eine besonders stabile Gruppe der sonst reaktiven Carbene. [97] Carbene sind zweiwertige Kohlenstoffe mit zwei freien Elektronen und besitzen somit ein Elektronensextett. Sie kommen in zwei Zuständen als Singulett- und Triplett-Carbene vor und weisen jeweils charakteristische Eigenschaften auf (siehe Abbildung 10). [98–100] Bei den Eigenschaften unterscheidet man zwischen freien Carbenen, Carben-Metall-Komplexen und den Resten in direkter Carbenposition. Der eingenommene Zustand hängt von der Energie des Moleküls ab und wird hauptsächlich durch die Liganden des Carbens festgelegt.

Eine zusätzliche Einteilung findet in Fischer- und Schrock-Carbene statt, wobei Fischer-Carbene im Singulett-Zustand vorliegen und Reste mit positivem Mesomerie- und meist negativem induktiven Effekt besitzen. Eine Carben-Metall-Bindung von Fischer-Carbenen ist elektrophil und zeigt nur leichten Doppelbindungscharakter. Fischer-Carbene reagieren zudem bevorzugt mit Übergangsmetallen niedriger Oxidationsstufe.

N-heterozyklische Carbene liegen im Singulett-Zustand vor und gehören zu den Fischer-Carbenen. Sie können mit zwei Stickstoffen in direkter Nachbarposition zum Carben, Ringsystemen und verschiedenen Resten sehr stabile Metallbindungen eingehen. Die chemischen Eigenschaften der NHCs werden durch die Art des Ringsystems, die Stickstoffsubstituenten und ebenfalls durch die Reste am Ringsystem beeinflusst. Bei Benzimidazolen kann man zum Beispiel mit verschiedenen Substituenten in 5-Position die Löslichkeit, Stabilität und Reaktivität der entstehenden Carbene stark beeinflussen.

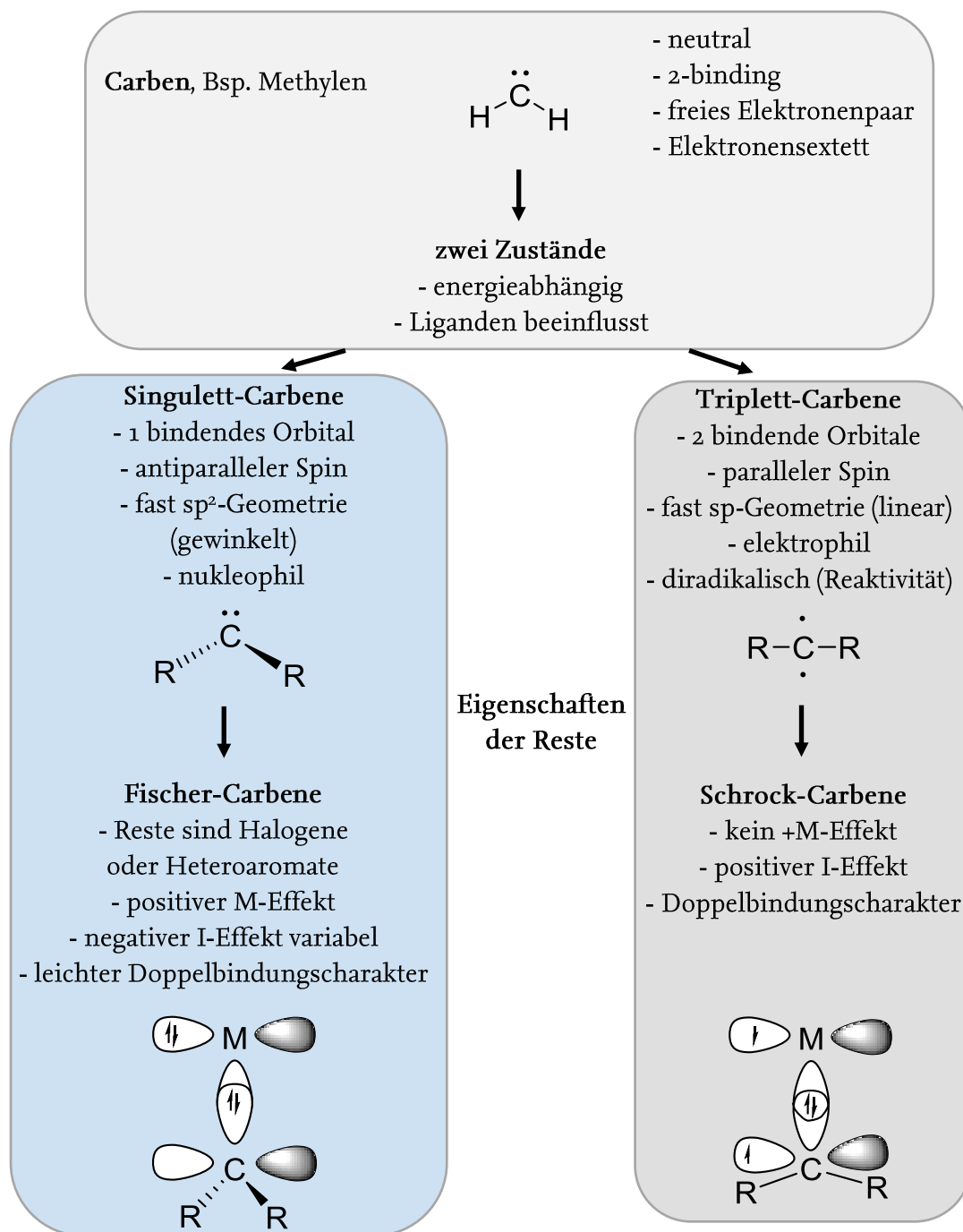


Abbildung 10 Eigenschaften der verschiedenen Carbene

Der Carbenkohlenstoff geht über sein doppelbesetztes σ -Orbital eine starke Hinbindung mit dem freien Orbital des Metalls ein. Gleichzeitig findet eine Rückbindung über das doppelbesetzte π -Orbital des Metalls zum leeren Carbenorbital statt. Im räumlichen Hintergrund stabilisieren die Stickstoffe der NHCs das Carben. Durch ihren negativ induktiven Effekt verringern sie als σ -Elektronenakzeptoren auf der einen Seite die Energie des Carbens durch die Stabilisierung des freien Elektronenpaares. Der positive Mesomerieeffekt und das freie

Elektronenpaar stabilisieren auf der anderen Seite das freie π -Orbital des Carbenkohlenstoffs. Diese hohe Stabilität erklärt, warum freie NHCs isoliert werden können und Komplexe mit Übergangsmetallen leicht zu synthetisieren und isolieren sind. [26, 97, 101] Zusätzlich sind Übergangsmetalle Lewisäuren und NHCs gehören zu den stärksten neutralen Lewisbasen, was sie zu guten Komplexpartnern macht

Alkine, die durch eine Dreifachbindung zwischen zwei Kohlenstoffen definiert werden, sind unter den möglichen Goldliganden noch eine relativ junge Gruppe, während sie mit anderen Metallen bereits öfter kombiniert wurden. [57, 102–105] Sie sind in der Natur relativ wenig verbreitet und stellen meist Abwehrstoffe dar. In der Medizin werden sie nur sporadisch genutzt. Bekannt sind z.B. Endiin-Strukturen wie das Zinostatin, das bis 2009 bei Leberkarzinom verwendet wurde. Ein weiteres Beispiel ist Mestranol, das ein Prodrug von Ethinylestradiol darstellt. Diese Substanz wird in Kapitel 2.2 genauer beschrieben. Betrachtet man chemische oder technische Arbeitsbereiche sind die Alkine dort häufiger vertreten. Das zum Schweißen genutzte Acetylen ist ein sehr bekannter Alkinvertreter. Gold(I)-Alkine werden für die Katalyse verwendet und die einfache Möglichkeit Polymere zu bilden machen Alkine interessant für die Synthese. [106] Die Lumineszenzeigenschaften können für bildgebende Methoden eingesetzt werden und es gibt Überlegungen, sie als molekulare optische Schalter zu verwenden. [52, 56, 59, 107] Für verschiedene biologische Testverfahren sind solche Eigenschaften neben einer Aktivität an Zielstrukturen von großem Vorteil, da sie die Analytik vereinfachen. [108] Vor allem bei relativ neuen Wirkstoffen sind Löslichkeit, Stabilität und Verteilung sehr interessant und einfacher zu bestimmen, wenn die Komplexe spezifisch mit einfachen analytischen Methoden untersucht werden können. [91]

Für die Synthese von Goldkomplexen sind die Alkine gut geeignet. Durch ihre Säureeigenschaften können sie relativ einfach deprotoniert werden und über die negative Ladung eine σ -Bindung mit einem Metall eingehen. In Kombination mit NHCs oder Phosphanen ergeben sich durch die eingebrachte negative Ladung neutrale Gold(I)-Komplexe. Aus chemischem Interesse gab es erste Untersuchungen zu NHC-Au(I)-Alkinen, Daten für eine biologische Nutzung sind jedoch noch relativ wenig gesammelt worden. Neben der analytischen Nutzbarkeit werden die Komplexe auf ihr Potential als Antibiotika und Zytostatika untersucht. [52, 56, 57, 73, 91, 104, 109, 110]

Goldkomplexe sind in ihrer Vielfalt eine Gruppe von Organometallverbindungen, die ein breites Spektrum an chemischen Eigenschaften umfasst. Diese kann man zum einen für die Synthese nutzen, zum anderen zeigen viele Verbindungen eine Aktivität mit oder gegen biologische Systeme. Komplexe, die als potentielle Wirkstoffe eingesetzt werden können, oder helfen Krankheitsbilder besser zu verstehen, sind in unserer heutigen Zeit und vor allem unter dem Aspekt von Wirkstoffresistenzen extrem kostbar. Je größer die Zahl der Kandidaten ist, desto besser für die Medizin.

Unter diesen Aspekten sind Gold(I)-Komplexe eine vielversprechende Gruppe neuer Verbindungen, die jedoch noch unter verschiedenen Blickwinkeln untersucht werden muss. Vor allem sollten die Strukturen, die wirkliche Targets darstellen, identifiziert werden.

2 Ziele der Arbeit und Darstellung der Themenbereiche

Die in Kapitel 1.3 erwähnten Arbeiten, die daraus erzielten Ergebnisse zu Gold(I)-Komplexen und die große Nachfrage nach neuen selektiven Wirkstoffen für die Krebstherapie motivierten zu der vorliegenden Arbeit. Die Ziele der Arbeit und die Unterteilung in einzelne Themengebiete finden sich auf den folgenden Seiten.

Die Arbeit unterteilt sich in zwei Themenbereiche, die die Untersuchung zweier Substanzklassen umfassen. Die Substanzen stellen Organometallverbindungen mit Gold(I) als Zentralatom dar. Bindungspartner des Gold(I) sind NHCs, Phosphane und Alkine, wobei diese zum einen als NHC-Au(I)-Alkine und zum anderen als Phosphan-Au(I)-Alkine komplexiert werden. Gemeinsam ist den beiden Themenbereichen somit Gold(I) als Zentralatom und ein Alkinligand als einer der beiden möglichen Koordinationspartner.

Als erstes Ziel dieser Arbeit ergibt sich die Synthese, analytische Charakterisierung und biologische Untersuchung von NHC-Au(I)-Alkinen. Im Einzelnen geht es um folgende Punkte:

- Syntheseerschließung und Herstellung von vier Serien verschiedener NHC-Au(I)-Alkine
- Charakterisierung und Identifizierung dieser Komplexe mittels analytischer Methoden wie Kernresonanzspektroskopie (NMR), Elementaranalyse (CHN) und Massenspektrometrie
- Erschließung geeigneter biologischer Testverfahren und Untersuchung des Potentials der neuen Substanzklasse als zytotoxische Wirkstoffe anhand von antiproliferativen Effekten, Enzyminhibition und Zellaufnahme
- Zusammenfassung und Deutung der erhaltenen Daten, Bewertung dieser im Hinblick auf Strukturwirkungsbeziehungen, Targetfindung und Nutzen
- Identifizierung möglicher Folgeuntersuchungen und Weiterentwicklung der Substanzen

Das zweite Ziel dieser Arbeit umfasst die strukturelle Weiterentwicklung und weitere Untersuchung von Phosphan-Au(I)-Alkinen, die Meyer et al. [60] und Andermark et al. [51] bereits dargestellt haben, und beinhaltet folgende Punkte:

- Erhöhung der Ausbeute für Verbindungen mit kleinen Phosphanliganden
- Löslichkeitsverbesserung basierend auf Veränderungen des Alkinliganden und Aktivitätsuntersuchung der neuen Komplexe
- Löslichkeitsverbesserung und Aktivitätsuntersuchung mit Hilfe von Lösungsvermittlern
- Zusammenfassung und Deutung der erhaltenen Daten, Bewertung dieser im Hinblick auf Strukturwirkungsbeziehungen und Erschließung von Folgeprojekten

2.1 NHC-Au(I)-Alkine

Die Synthese der neuen Komplexklasse mit Gold(I) als Zentralatom und verschiedenen NHC- und Alkinliganden als Bindungspartner ist der erste Themenbereich der vorliegenden Arbeit. Nach erfolgreicher Synthese findet die Untersuchung dieser Komplexklasse als potentielle Zytostatika statt, wobei verschiedene biologische Methoden getestet und Daten zu Zielstrukturen und Strukturwirkungsbeziehungen gesammelt werden. Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, gibt es viele mögliche Liganden, die mit Gold(I) zu stabilen Komplexen gekoppelt werden können.

Basierend auf Arbeiten von Dr. Riccardo Rubbiani [92, 111], Andreas Meyer [60] und Vincent Andermark [51] aus dem Arbeitskreis Ott des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie soll die fehlende Ligandenkombination aus den in Abbildung 11 gezeigten Substanzklassen hergestellt und auf ihr Potential als zytotoxischer Wirkstoff untersucht werden. Abbildung 11 zeigt [Triphenylphosphan-(1,3-diethylbenzylimidazol-2-yliden)]gold(I) Iodid (im Folgenden **Ref1** genannt), [2-(4-Methoxyphenyl)ethin-1-yl](triphenylphosphan)gold(I) (im Folgenden **Ref2** genannt) und Komplex **23** ((1,3-Diethylbenzimidazol-2-yliden)(2-(4-methoxyphenyl)-ethinyl)gold(I)) als Vertreter der jeweiligen Komplexklasse. Die neue Klasse beinhaltet wie erwähnt Gold(I) als Zentralatom und je ein *N*-heterozyklisches Carben und Alkin als Liganden.

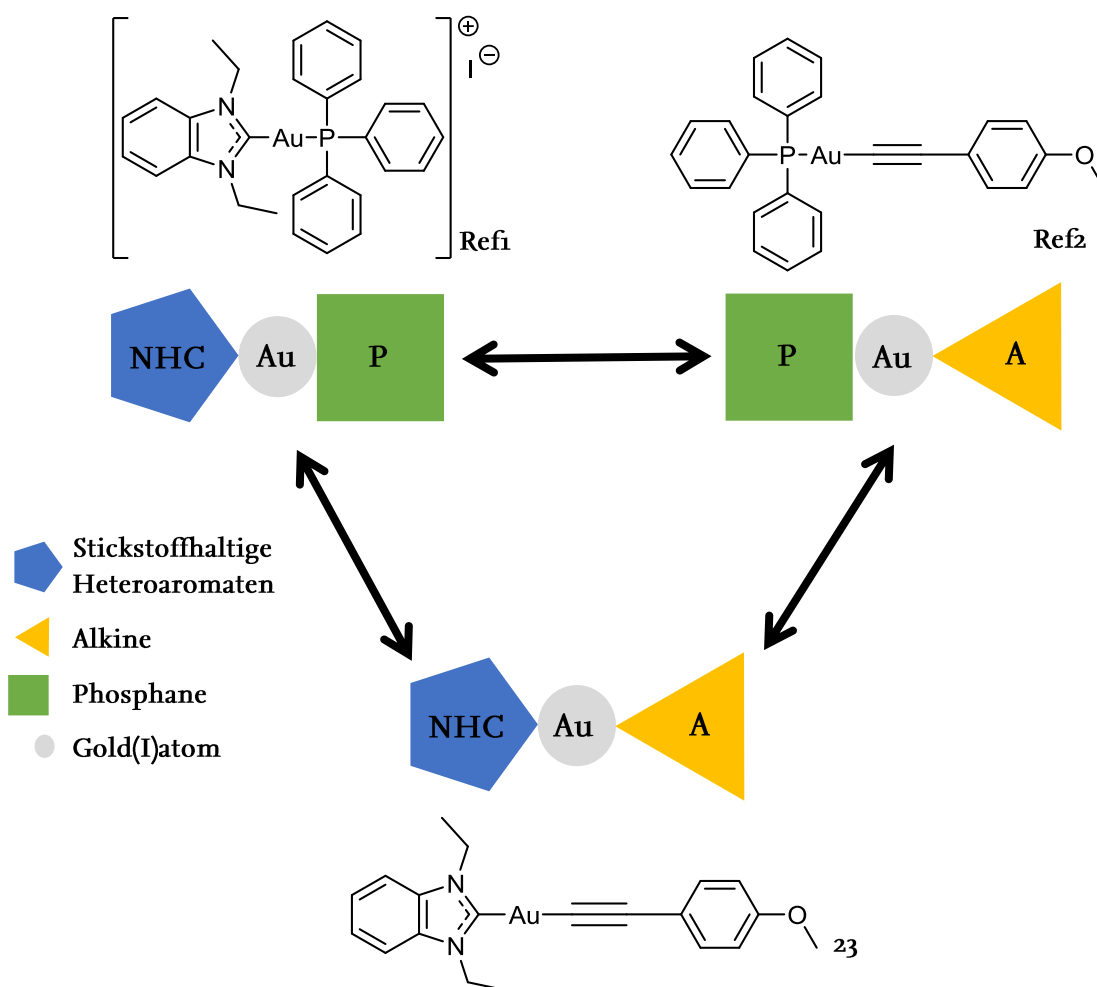


Abbildung 11 Übersicht der drei Substanzklassen mit verschiedenen Ligandenkombinationen, als Beispiel gezeigt Ref1, Ref2 und Komplex 23

In früheren Arbeiten wurden NHC-Au(I)-Phosphane, Phosphan-Au(I)-Alkyne, NHC- und Phosphan-Au(I)-Halogenide sowie bis-NHC-Au(I)-Komplexe untersucht. [34, 51, 60, 68, 70, 92, 93, 111–114] Die verschiedenen Wirkstoffklassen beeinflussen Krebszellen auf unterschiedliche Weise. Veränderungen der einzelnen Liganden innerhalb einer Klasse können ebenfalls zu unterschiedlichem Verhalten in den Zielzellen führen, sodass auch hier Variationen von Interesse sind.

Da es bis zum Beginn der Arbeit nur vereinzelte Publikationen zu NHC-Au(I)-Alkinen gab, wird als erster Schritt ein reproduzierbarer Syntheseweg für die Substanzklasse erschlossen. Hierfür werden potentielle Liganden gesucht. Zunächst werden verschiedene NHC-Grundkörper verwendet, die an beiden Stickstoffen Alkylgruppen tragen. Hierfür werden Imidazol und verschiedene Benzimidazole ausgewählt (siehe Abbildung 12).

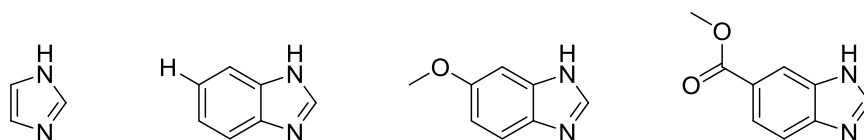


Abbildung 12 Mögliche Grundkörper für NHC-Liganden

Imidazol als relativ kleiner Heteroaromat ist im Hinblick auf Größe, Lipophilie und somit Löslichkeit der NHC-Au(I)-Alkine von Interesse. Rubbiani et al. haben gezeigt, dass Benzimidazol (kurz HB) und 5-Methoxybenzimidazol (kurz MB) als NHC-Au(I)-Cl eine gute Aktivität gegen Krebszellen aufweisen, sodass sie ebenfalls für die Kopplung mit Alkinen interessant sind. [112] 5-Methoxycarbonyl-1*H*-benzimidazol (kurz EB) ist ein Benzimidazol, dessen Esterligand an 5-Position im Vergleich zu den bisherigen Resten einen negativen mesomeren Effekt aufweist und dadurch die Elektronendichte des Liganden verändert. Diese Änderung kann die Reaktivität und dadurch auch die Synthese und Aktivität der Komplexe beeinflussen.

Für die Stickstoffsubstitution der NHCs werden Methyl- und Ethylgruppen ausgewählt. Da Rubbiani et al. in einer Untersuchung verschiedener Stickstoffreste (Abbildung 13) gezeigt haben, dass eine Ethylierung zu den besten zytotoxischen Aktivitäten in Kombination mit Gold(I) führt, wird dieser Stickstoffrest übernommen. [113, 115, 116]

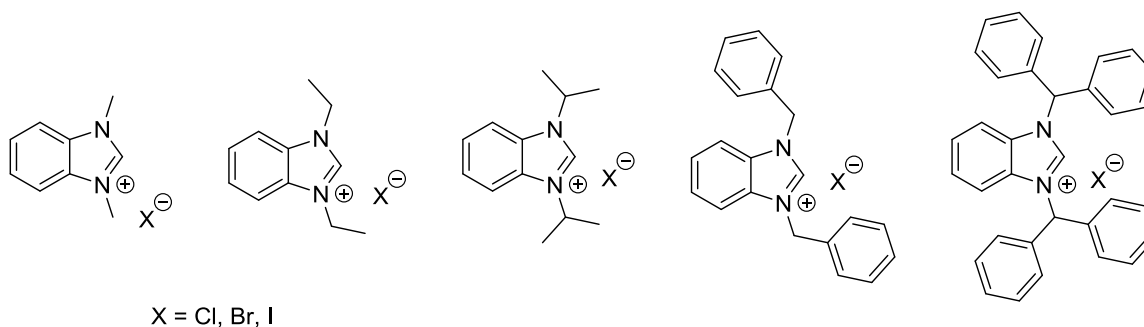


Abbildung 13 Von Rubbiani et al. untersuchte Stickstoffsubstituenten

Die vergleichsweise kleinen Substituenten schirmen sterisch den Carben-Kohlenstoff und das Goldchlorid nicht so stark ab wie zum Beispiel Isopropyl-, Benzyl- oder Diphenylmethylsubstituenten, sodass hierdurch die Transmetallierung und der Ligandenaustausch nicht unnötig erschwert werden. Basierend auf dieser Überlegung werden ebenfalls Methylreste als Stickstoffsubstituenten verwendet, um den Erfolg der Synthese zu erhöhen.

Als zweiter Goldligand wird das 1-Ethynyl-4-methoxybenzol (kurz MA) (siehe Abbildung 14) ausgewählt, welches in Arbeiten von Meyer et al. in Kombination mit Triphenylphosphan als Goldkomplex eines der aktivsten Alkine darstellt. [60] 1-Ethynyl-4-methoxybenzol ist ein relativ kleiner Ligand und Nebenreaktionen sind selten, sodass es sich für eine Syntheseentwicklung gut eignet.

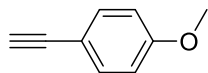


Abbildung 14 1-Ethynyl-4-methoxybenzol als Alkinrepräsentant zur Syntheseentwicklung

Um die Synthese in der Entwicklungsphase zu vereinfachen, wird zunächst das Alkin als konservierter Ligand definiert und mit den verschiedenen NHCs kombiniert, um acht NHC-Au(I)-Alkin-Komplexe herzustellen (siehe Abbildung 15).

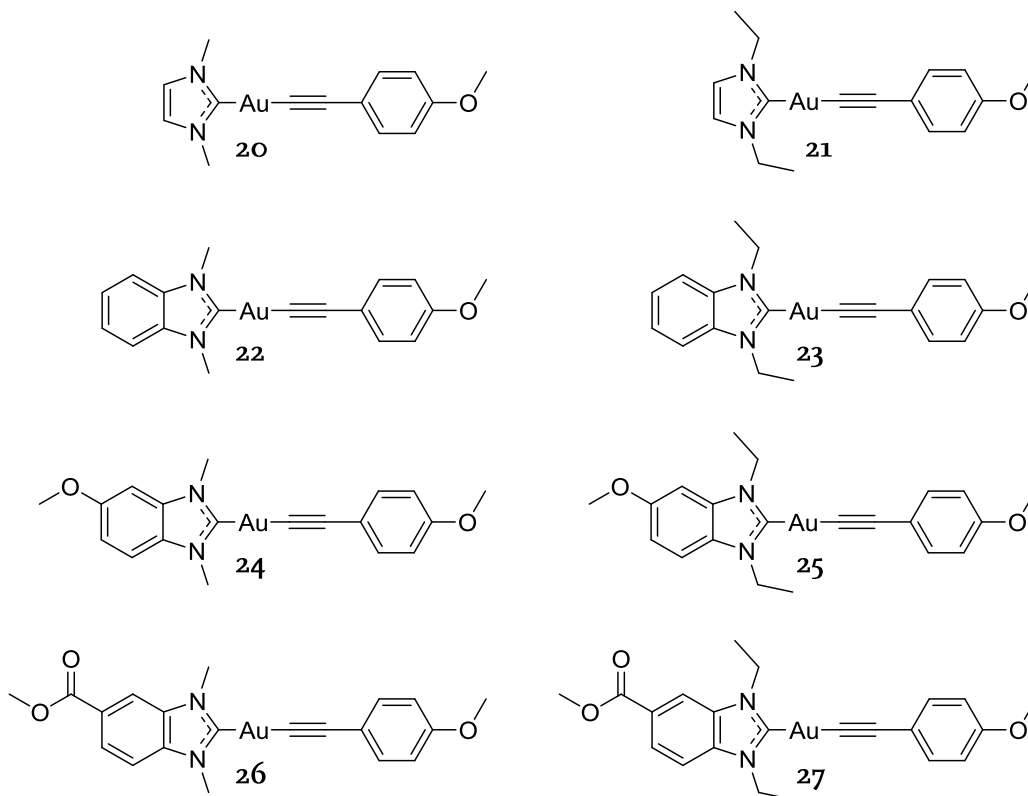


Abbildung 15 Übersicht der ersten Serie von NHC-Au(I)-Alkinen

Die so hergestellten Komplexe sollen dann auf ihre biologische Aktivität als potentielle Zytostatika untersucht werden. Hierfür werden zuerst die Zytotoxizität bzw. die antiproliferativen Effekte bestimmt. Die Aufnahme in Zellen sowie die Interaktion mit verschiedenen Proteinen des Zellkulturmediums sollen genauere Information über das Verhalten der Substanzen während der Versuche geben und Hinweise auf die Bioverteilung

liefern. Eines der identifizierten Targets von Gold(I)-Komplexen ist die Thioredoxinreduktase. Die Inhibition dieses Enzyms ist eine der möglichen Erklärungen für die antiproliferative und zytostatische Aktivität der mono-Gold(I)-Komplexe und soll deshalb für die Substanzen am isolierten Enzym als auch auf Zellebene untersucht werden.

2.2 Erweiterung der NHC-Au(I)-Alkin-Serie

In einem zweiten Schritt soll die Komplexserie mit der funktionierenden Synthese um drei neue Serien erweitert werden. Ob die Synthesemethode auch mit anderen Alkinen funktioniert, soll ebenfalls untersucht werden. Die Synthese der Komplexe führte Sven Friedrichs im Zuge seines Praktikums als Pharmazeut im praktischen Jahr unter meiner Betreuung durch.

Durch die Etablierung einer Fluor-Messmethode mittels HR-CS MAS (*high resolution continuum source molecular absorption spectroscopy*) durch Dr. Claudia Schmidt im Arbeitskreis entstand die Möglichkeit, Substanzen, die Gold und Fluor enthalten, genauer zu analysieren. [117–119] Dabei kann untersucht werden, was mit den Substanzen während der biologischen Versuche passiert und wie sich die verschiedenen Substanzen den Zellen gegenüber verhalten. Hierfür wird eine neue Serie von NHC-Au(I)-Alkinen hergestellt, wobei die beiden Ligandengruppen mit einem Fluor- oder Methoxysubstituenten gekoppelt sind (siehe Abbildung 16).

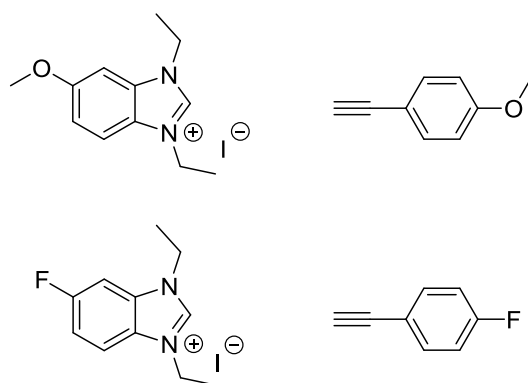


Abbildung 16 NHC- und Alkinliganden für die zweite Komplexserie

Aufgrund der guten antiproliferativen Effekte (Kapitel 5.1) wird das 1,3-Diethyl-5-methoxybenzimidazoliumiodid als NHC-Grundkörper ausgewählt und um das 1,3-Diethyl-5-fluorbenzimidazoliumiodid ergänzt. Als Alkinliganden sollen analog 1-Ethynyl-4-

methoxybenzol und 1-Ethynyl-4-fluorbenzol (kurz FA) fungieren, sodass sich folgende erweiterte Serie ergibt:

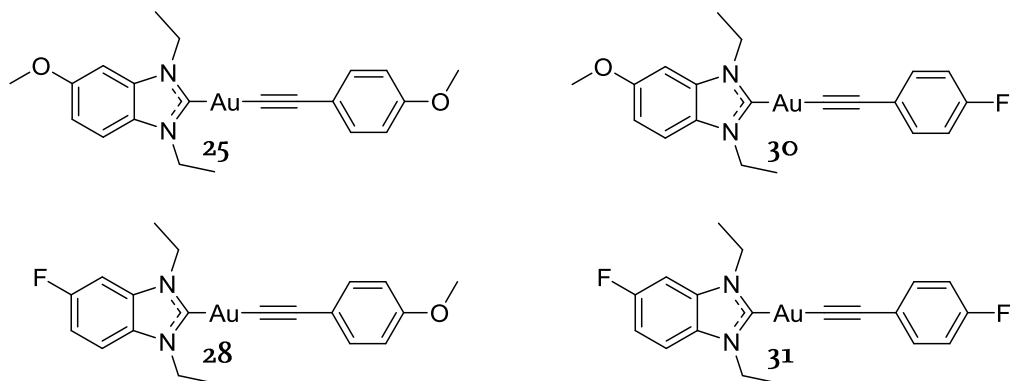


Abbildung 17 Erweiterung der NHC-Au(I)-Alkine mit Methoxy- und Fluorsubstituenten zur zweiten Serie

In Abbildung 17 sind demnach drei neue und eine Substanz der ersten Serie zu sehen. Anhand der Zellaufnahme und der Verhältnisse von Gold(I) und Fluor kann ermittelt werden, ob der gesamte Komplex in die Zelle aufgenommen oder ob einer der Liganden vorher abgespalten wird. Der Fluorgehalt der verschiedenen Ligandenkombinationen kann ebenfalls zeigen, welcher Ligand möglicherweise abgespalten wird, wenn es zu einer Dissoziation kommt.

Weiterhin soll der Einfluss des *para*-Alkin-Substituenten untersucht werden. Deshalb wird zusätzlich zu den Methoxy- und Fluor-Substituenten eine dritte Serie mit Ethynylbenzol (kurz HA) als Alkin-Ligand betrachtet (siehe Abbildung 18).

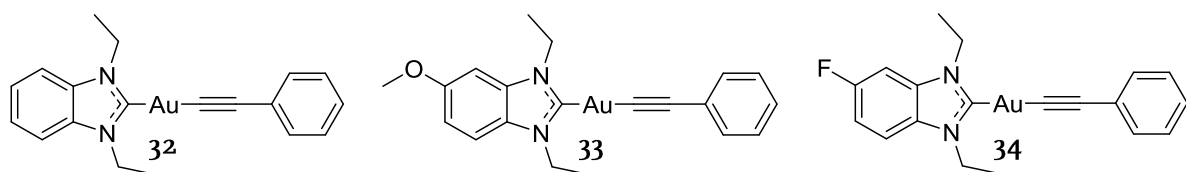


Abbildung 18 Komplexe der dritten Serie von NHC-Au(I)-Alkinen

In dieser Serie sind durch das Proton als *para*-Substituent die beeinflussenden Effekte auf die Elektronendichte des Alkinliganden reduziert und es können Ergebnisse für das unsubstituierte Alkin gesammelt werden.

Um die Serien zu vervollständigen, wird zusätzlich das unsubstituierte NHC-Au(I)-Cl mit dem 1-Ethynyl-4-fluorbenzol gekoppelt, sodass alle Kombinationen der Liganden untersucht werden können.

Insgesamt sollen die Daten aus den drei Komplexserien am Ende der Arbeit Informationen zu Strukturwirkungsbeziehungen sowie Wirkmechanismen liefern und es ermöglichen, gezielt wirksamere Verbindungen herzustellen.

Die letzte Erweiterung umfasst zwei Substanzen, die durch Ähnlichkeit mit Naturstoffen selektiv Krebszellen oder bestimmtes Gewebe als Target haben sollen. Ethinylestradiol und sein Prodrug Mestranol (17 α -Ethinyl-3-methoxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -ol) gehören zu den wenigen medizinisch genutzten Alkinen. Sie werden als Kontrazeptiva oder zur Hormonersatztherapie eingesetzt. In der Leber wird Mestranol über eine Etherspaltung demethyliert und in die aktive Form umgewandelt, die als einzige mit den Estrogenrezeptoren interagieren kann (siehe Abbildung 19). Die Aktivierung in der Leber unterliegt starken individuellen Schwankungen, sodass die Bedeutung von Mestranol mittlerweile stark zurückgegangen ist. [120, 121]

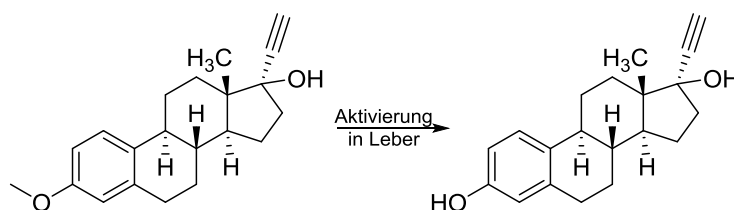


Abbildung 19 Mestranolaktivierung zu Ethinylestradiol

Da im Arbeitskreis zwei Brustkrebszelllinien kultiviert werden, die unterschiedlich auf Hormone reagieren, ist es möglich, den Einfluss eines solchen Liganden direkt in der Kultur zu beobachten. MCF-7 ist eine estrogenabhängige Brustkrebszelllinie und MDA-MB-231 zeigt keine Hormonabhängigkeit.

Für eine Kopplung an NHC-Au(I)-Cl sind die beiden Stoffe deshalb von Interesse, weil eine Gewebeselektivität durch den Liganden erzielt und gleichzeitig der Einfluss einer hormonellen Struktur untersucht werden kann. [71, 109, 122–124]

Die veretherte Form scheint für eine erfolgreiche Synthese vielversprechender als das Ethinylestradiol selbst. Da der Ligandenaustausch unter basischen Bedingungen abläuft, wäre eine Phenoldeprotonierung möglich und könnte zu unerwünschten Nebenprodukten führen. Für die Serie werden 1,3-Diethylbenzimidazoliumiodid und 1,3-Diethyl-5-methoxy-

benzimidazoliumiodid ausgewählt und mit 17 α -Ethinyl-3-methoxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -ol (Mestranol) gekoppelt (siehe Abbildung 20).

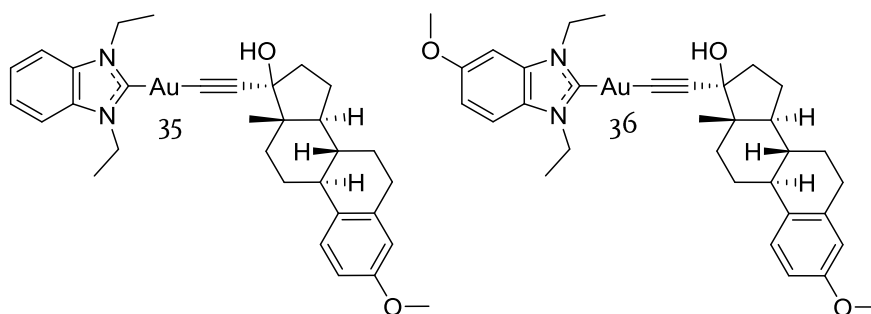


Abbildung 20 Komplexe 35 und 36 nach der Kopplung mit Mestranol

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Komplexe mit Komplexnummer, Kurzname und Struktur (siehe Tabelle 2).

Komplex	Kurzname	Struktur
20	Im-Methyl-Au-MA	
21	Im-Ethyl-Au-MA	
22	HB-Methyl-Au-MA	
23	HB-Ethyl-Au-MA	
24	MB-Methyl-Au-MA	
25	MB-Ethyl-Au-MA	

26	EB-Methyl-Au-MA	
27	EB-Ethyl-Au-MA	
28	FB-Ethyl-Au-MA	
29	HB-Ethyl-Au-FA	
30	MB-Ethyl-Au-FA	
31	FB-Ethyl-Au-FA	
32	HB-Ethyl-Au-HA	
33	MB-Ethyl-Au-HA	
34	FB-Ethyl-Au-HA	

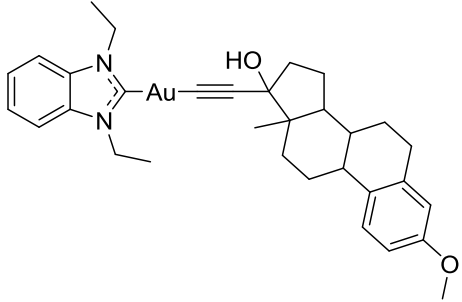
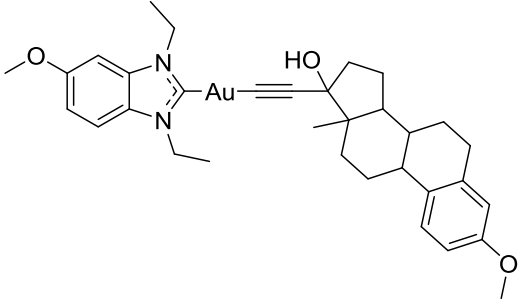
35	HB-Ethyl-Au-Mestranol	
36	MB-Ethyl-Au-Mestranol	

Tabelle 2 Komplexübersicht mit Nummer, Kurzname und Struktur

2.3 Phosphan-Au(I)-Alkine

Der zweite Themenbereich dieser Arbeit besteht aus der Syntheseoptimierung und strukturellen Erweiterung verschiedener Phosphan-Au(I)-Alkine. Innerhalb des SynFoBiA-Verbundprojektes des Zentrums für Pharmaverfahrenstechnik (PVZ) nehmen die Phosphan-Au-Alkine die Rolle eines schwer löslichen Wirkstoffkandidaten ein, dessen Synthese optimiert und die Löslichkeit verbessert werden soll, um biologische Untersuchungen besser zugänglich zu machen. Letzteres ist durch die Veränderung von Liganden möglich, aber auch durch Löslichkeitsvermittler, zu denen zum Beispiel Lipidnanocarrier gehören. [125]

In den Arbeiten von Meyer et al. und Andermark et al. kristallisierten sich **Ref2** und [2-(4-Methoxyphenyl)ethin-1-yl](triethylphosphan)gold(I) (im Folgenden **Ref3** genannt) als vielversprechende Kandidaten der Phosphan-Au(I)-Alkine heraus (siehe Abbildung 21 und Abbildung 22). [51, 60, 93]

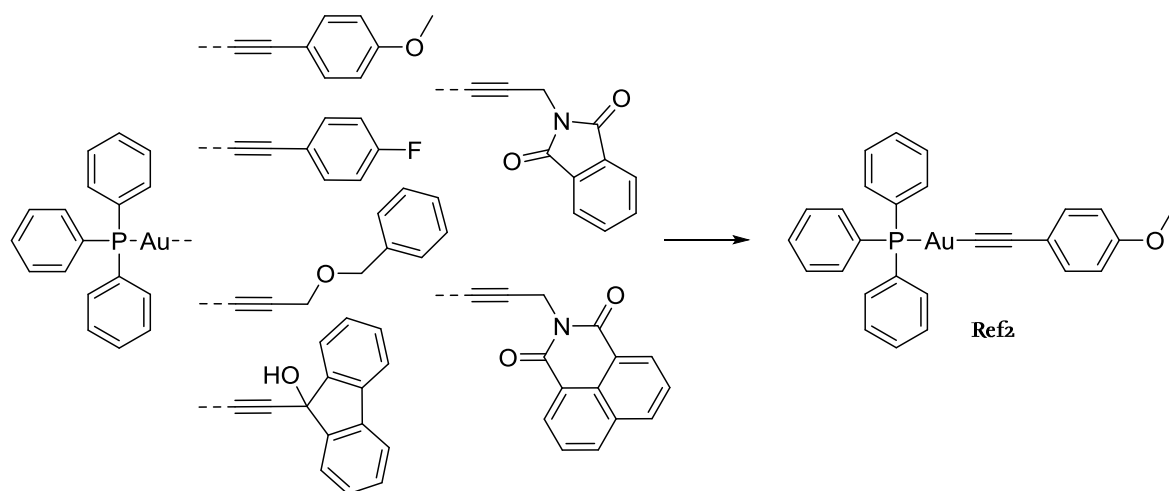


Abbildung 21 Phosphan-Au(I)-Alkine aus vorangegangenen Arbeiten mit Triphenylphosphan und **Ref2** als interessantesten Kandidaten

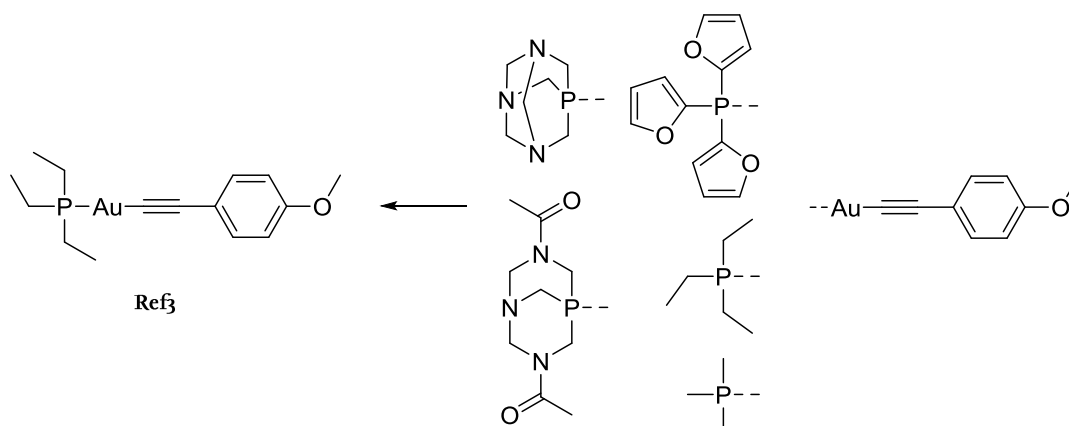


Abbildung 22 Phosphan-Au(I)-Alkine aus vorangegangenen Arbeiten mit MA und Ref3 als interessantesten Kandidaten

Die Synthese dieser Substanzklasse soll weiter optimiert werden, da die Ausbeuten für kleinere Phosphane wie das Triethylphosphan bisher sehr gering ausfallen. Gleichzeitig werden weitere Alkine in die biologischen Untersuchungen einbezogen.

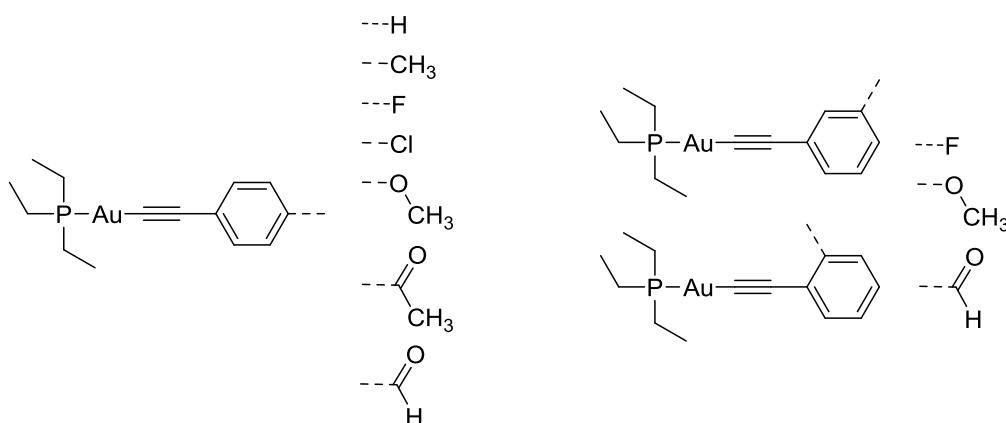


Abbildung 23 Variationen der Alkinliganden zur Verbesserung der Löslichkeit sowie Untersuchung der Aktivität der Triethylphosphan-Au(I)-Komplexe

An der Alkinerweiterung haben Dr. Svenja Kankowski [126] und Andre Prause [127] im Zuge einer Master- bzw. Diplomarbeit gearbeitet und ausgehend von 1-Ethynyl-4-methoxybenzol verschiedene Reste in ortho-, meta- und para-Position des Alkinliganden untersucht (siehe Abbildung 23). Die erste Gruppe neuer Komplexe beinhaltet verschiedene para-Substituenten am Alkinaromaten. Die zweite Gruppe soll den Einfluss der Substitutionsposition genauer untersuchen, wofür je ein Fluor-, Methoxy- bzw. Formaldehydsupstituent in ortho-, meta- bzw. para-Position an den Alkinaromaten eingeführt wurde.

Die Ergebnisse sind in den erwähnten Arbeiten beschrieben und werden in dieser Arbeit verglichen, diskutiert und zusammengefasst. [51, 60, 126, 127]

Die Solubilisierung von schwer löslichen Molekülen stellt für viele Forschungsgruppen eine Möglichkeit dar, Stoffe biologischen Versuchen zu unterziehen, die mit der reinen Substanz nicht durchführbar sind. Die Lösungsvermittlung soll in Form von wirkstoffbeladenen Nanoemulsionen, bestehend aus Lipidnanocarriern, weiter untersucht werden. [128, 129] Da die ersten beladenen Nanoemulsionen nur sehr wenig Gold(I) enthielten [51] und die Effekte der unbeladenen Nanoemulsionen innerhalb der genutzten Zellkultur noch unbekannt waren, wird die Beladung verbessert und die Nanoemulsionen werden genauer auf ihr Verhalten in der Zellkultur untersucht. Bei ausreichender Beladung werden Zytotoxizität und Zellaufnahme geprüft.

Basis der Lösungsvermittler sind Nanoemulsion bzw. Liposomen, die von Dr. Katrin Göke aus dem Institut für Pharmazeutische Technologie der Technischen Universität Braunschweig aus dem Arbeitskreis von Frau Prof. Bunjes hergestellt wurden. Die Herstellungs- und Verarbeitungsmethoden sind in Kapitel 8.7 beschrieben.

Um Trägereffekte einschätzen zu können, werden diese Nanoemulsionen zunächst selbst auf ihr Verhalten in Zellkulturmedium sowie auf ihren Einfluss auf die genutzten Zellen überprüft. [130, 131]

Mit Hilfe dieser Versuche sollen die geeignetsten Kandidaten für eine Beladung ausgesucht und mit den beiden Komplexen **Ref₂** und **Ref₃** beladen werden. Der Goldgehalt in den Nanoemulsionen kann mittels HR-CS AAS ermittelt werden, um basierend auf diesen Gehalten antiproliferative Effekte und die Zellaufnahmen zu untersuchen.

3 Berechnung chemischer Eigenschaften der NHC-Au(I)-Alkine

Die Charakterisierung einer neuen Substanzklasse umfasst nicht nur allein die biologische Untersuchung. Die chemischen Eigenschaften der Komplexe können ebenfalls wichtige Hinweise für die Synthese oder Erklärungen für eine bestimmte Aktivität liefern. Um die chemischen Eigenschaften der neu synthetisierten Klasse der NHC-Au(I)-Alkine besser einschätzen zu können, werden verschiedene Parameter rechnerisch bestimmt und die Ergebnisse dieser Rechnungen im folgenden Kapitel im Hinblick auf die Aktivität der einzelnen Komplexe gedeutet.

Prof. Alvaro Munoz Castro von der *Universidad Autonoma de Chile* führte mittels der Dichtefunktionaltheorie (DFT) [132] die Berechnung der im folgenden Kapitel beschriebenen Parameter durch. Hierbei werden digital mit Hilfe von NMR-Daten und, sofern vorhanden, Kristallstrukturen die energetisch günstigsten Konformationen, also der quantenmechanische Grundzustand, der jeweiligen Substanz ermittelt. Aus dieser Konformation heraus können unter Verwendung des Hohenberg-Kohn-Theorems Bindungslängen, Winkel, molekulare Dipolmomente, elektrostatische Ladungsverteilungen und Bindungsdissoziationsenergien (BDE) ermittelt werden. Die Berechnung erfolgt basierend auf der ortsabhängigen Elektronendichte anhand der Born-Oppenheimer-Näherung. Dabei wird das Programm ADF 2012 (*Amsterdam Density Functional*) der Firma *Scientific Computing & Modelling* (SCM, Amsterdam, Niederlande) unter Verwendung verschiedener Anpassungsparameter zu Hilfe genommen.

Von Interesse für die Berechnungen ist dabei zunächst die erste NHC-Au(I)-Alkin-Serie mit Methyl- und Ethylsubstituent, um den Einfluss der Stickstoffsubstituenten genauer zu betrachten. Gleichzeitig ist ein Vergleich der NHC-Grundkörper untereinander möglich.

Des Weiteren kann durch die erweiterten Folgeserien der Einfluss des Substituenten an 5-Position des Benzimidazolgrundkörpers und des para-Substituenten des Alkins genauer untersucht werden. Die Daten können bei der Syntheseentwicklung helfen und unterstützen Untersuchungen im Hinblick auf Aktivität und Strukturwirkungsbeziehungen. Die Zusammenhänge zwischen rechnerisch ermittelten Eigenschaften und der tatsächlichen Aktivität werden in Kapitel 7.1 diskutiert.

3.1 Geometrische Parameter

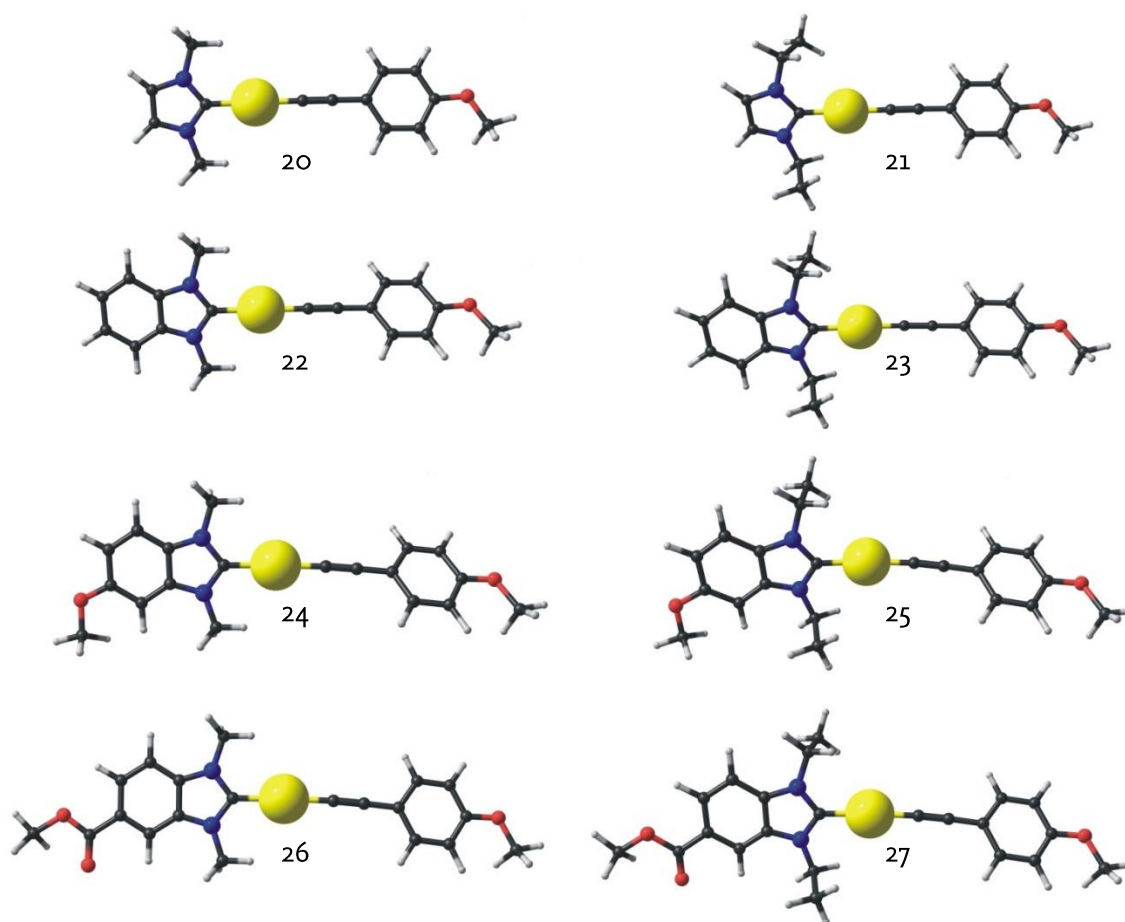


Abbildung 24 Optimale Konformation der NHC-Au(I)-Alkine der ersten Serie

Die optimale Konformation der Substanzen wird rechnerisch ermittelt und ist beispielhaft in Abbildung 24 zu sehen. [133] Basierend auf diesen Konformationen werden alle folgenden Berechnungen durchgeführt.

Interessante geometrische Parameter sind für die NHC-Au(I)-Alkine zum einen die Bindungslängen des Gold(I)-Atoms zu seinen Liganden und zum anderen die Winkel der beiden Gold(I)-Liganden zueinander. Außerdem kann der Fragestellung, inwieweit sich die beiden Liganden im Komplex gegeneinander verdrehen und wie sich die Aromaten im Raum positionieren, mit den durchgeführten Berechnungen auch ohne Kristallstruktur nachgegangen werden.

Während bei den Phosphan-Au(I)-Alkinen mit dem Phosphan ein trigonal-pyramidal aufgebauter Ligand vorliegt, sind beide Liganden der NHC-Au(I)-Alkine bedingt durch die aromatischen Grundkörper planar strukturiert und weisen nur durch die verschiedenen

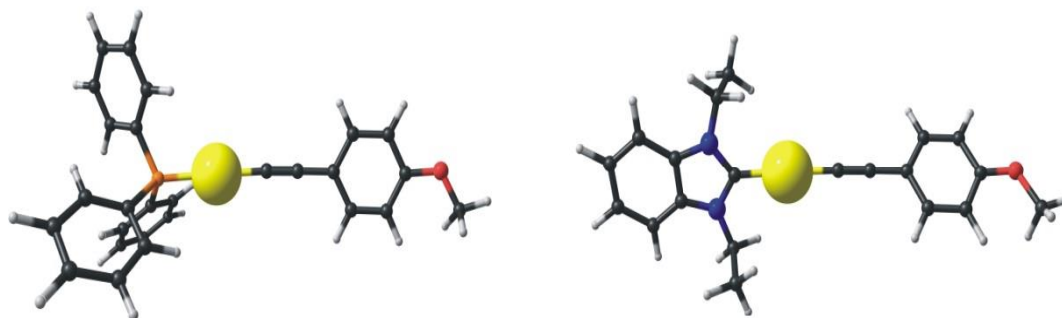


Abbildung 25 Ref2 (links) und NHC-Au(I)-Alkin 23 (rechts) im 3D-Model

Reste und Substituenten eine räumliche Ausdehnung auf. So ergeben sich relativ lange Komplexe, die aufgrund einer geringen Verdrehung der Aromatenebenen nahezu planar vorliegen. Abbildung 25 zeigt Ref2 im Vergleich zu Komplex 23. Der unterschiedliche räumliche Aufbau ist deutlich zu sehen, wobei ein Vergleich von Dreibein- und Einbeinstativ zur besseren Visualisierung herangezogen werden kann.

Betrachtet man die erste NHC-Au(I)-Alkin-Serie nur anhand ihrer Konformationsmodelle (Abbildung 24), lässt sich durch Austausch von Methyl- zu Ethylrest keine große Strukturveränderung erkennen. Genauso verhält es sich bei den verschiedenen NHC-Grundkörpern. Alle Substanzen scheinen eine lineare Struktur anzunehmen, was für Gold(I) als Zentralatom typisch ist. Die Ausrichtung der Aromaten zueinander variiert minimal je nach eingesetztem NHC-Grundkörper und verwendeten Stickstoffsubstituenten. Die errechneten Daten geben einen genaueren Einblick in die tatsächliche Struktur der jeweiligen Komplexe. Da bereits kleine sterische Änderungen oder eine Variation der Elektronendichten Einfluss auf die Interaktion mit möglichen Targets haben, werden diese genauer betrachtet.

In Tabelle 3 sind die Bindungslänge [Å] für die Bindungen von Au-NHC, Au-Alkin und der Alkindreifachbindung dargestellt. Zur leichteren Einschätzung sei erwähnt, dass ein Ångström [Å] 100 pm entspricht, was wiederum 10^{-10} m sind.

Komplex	Kurzname	Au-NHC (bzw. Phosphan)	Au-Alkin (bzw. Chlorido)	C-C Alkin
Ref2	TPP-Au-MA	2,307	1,987	1,230
14	HB-Ethyl-Au-Cl	1,993	2,290	-
16	MB-Ethyl-Au-Cl	1,999	2,293	-
19	FB-Ethyl-Au-Cl	1,991	2,290	-
20	Im-Methyl-Au-MA	2,041	1,978	1,231
21	Im-Ethyl-Au-MA	2,039	1,979	1,230
22	HB-Methyl-Au-MA	2,037	1,979	1,231
23	HB-Ethyl-Au-MA	2,034	1,979	1,230
24	MB-Methyl-Au-MA	2,037	1,978	1,230
25	MB-Ethyl-Au-MA	2,033	1,977	1,231
26	EB-Methyl-Au-MA	2,033	1,977	1,231
27	EB-Ethyl-Au-MA	2,031	1,977	1,231
28	FB-Ethyl-Au-MA	2,032	1,976	1,231
29	HB-Ethyl-Au-FA	2,037	1,981	1,231
30	MB-Ethyl-Au-FA	2,035	1,979	1,231
31	FB-Ethyl-Au-FA	2,033	1,977	1,231
32	HB-Ethyl-Au-HA	2,036	1,980	1,231
33	MB-Ethyl-Au-HA	2,036	1,979	1,231
34	FB-Ethyl-Au-HA	2,035	1,979	1,231

Tabelle 3 Bindungslängen in Å von Ref2, einigen NHC-Au(I)-Cl und den NHC-Au(I)-Alkinen, gezeigt sind die NHC-Gold-, Alkin-Gold- und die Alkin-Bindungslänge

Als erstes lässt sich der Unterschied in den Bindungslängen zwischen Phosphan-Au(I)-Alkinen und NHC-Au(I)-Alkinen erkennen, wobei der Abstand von Gold zu Phosphan mit 2,30 Å größer ist als der zum NHC-Liganden, der eher bei 2,03 Å liegt. Die Bindungslänge zum Alkin scheint bei den Phosphan-Au(I)-Alkinen ebenfalls minimal länger. Dies deutet darauf hin, dass zwischen den beteiligten Komplexteilen innerhalb der NHC-Au(I)-Alkine eine stärkere Anziehung vorliegt, was in den stärkeren σ -Donoreigenschaften der NHCs begründet liegen kann.

Die Dreifachbindung der Alkine selbst hat eine konstante Länge um 1,23 Å und scheint durch die NHC- bzw. Phosphanliganden nicht beeinflusst zu werden. Der Kohlenstoffabstand der Dreifachbindung scheint im Vergleich zum Ethin mit 1,20 Å minimal länger zu sein, unterliegt jedoch für keine Substituentenkombination einer Veränderung.

Wird der Chloridoligand (14, 16, 19) aus den Goldvorstufen durch ein Alkin ausgetauscht, scheint die Bindung von Gold zum NHC-Liganden (23, 25, 28) länger zu werden, während sich der Alkinligand näher am Gold befindet als der Chloridovorgänger. Mit dem Ligandenaustausch scheinen sich also die beiden Goldbindungen anzugleichen und sind nicht mehr so unterschiedlich lang wie unter dem Einfluss des stark elektronenziehenden und großen Chloridoliganden. Die Bindungslängen unterscheiden sich mit Chloridoligand um ca. 295 Å, während der Unterschied mit Alkinligand um 55 Å liegt. Der NHC-Ligand rückt minimal vom Goldkern weg und das Alkin rückt gleichzeitig zum Goldkern hin. Dies deutet auf eine minimal stabilere Bindung zum Alkin im Vergleich zum NHC-Liganden.

Vergleicht man die Stickstoffsubstituenten der NHCs, so ist die Bindungslänge zwischen NHC und Gold für alle ethylierten Komplexe im Schnitt um 0,003 Å kürzer, während die Gold-Alkin-Bindung konstant lang ist. Der mit der Kettenlänge steigende induktive Effekt könnte eine Erklärung für die etwas stabilere Bindung der am Stickstoff ethylierten NHCs sein.

Die NHC-Substituenten an 5-Position weisen einen geringen Einfluss auf die Bindungslänge beider Goldliganden auf. Die Änderung der Länge liegt im Bereich von 0,003 Å und zeigt eine Tendenz zur Verlängerung der Bindung in der folgenden Reihenfolge:



Der Ester entzieht dem System durch seinen negativ induktiven und mesomeren Effekt Elektronen und erlaubt dadurch keine weite Verteilung der Elektronen bis zum Zentralatom, sodass die Bindung minimal verkürzt wird. Fluor- und Methoxysubstituent führen dem System wiederum mit einem positiven mesomeren Effekt Elektronen zu, besitzen aber immer noch einen negativen induktiven Effekt und das Fluor starke Elektronennegativität. Insgesamt sind diese Effekte aber minimal ausgeprägt und es stellt sich die Frage, ob sich wirklich eine signifikante Aktivitätsänderung erkennen lässt. In Kapitel 5.1 und 7.1 werden die errechneten Daten mit den Laborergebnissen verglichen.

Der Austausch des para-Substituenten des Alkins hat keinen signifikanten Einfluss auf die Bindungslängen beider Liganden.

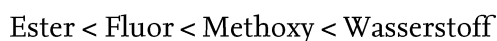
Tabelle 4 zeigt die Winkel [°] der NHC- und Alkinliganden zueinander. Insgesamt scheinen die NHC-Au(I)-Alkine eine planare Anordnung zu haben, wobei die beiden Aromaten je nach Substitution unterschiedlich gegeneinander verdreht sind. Eine lineare Geometrie ist für Gold(I) typisch, und die gewählten Liganden ordnen sich deshalb relativ flach an. In einer solchen Konformation ist eine Schichtung mit Gold-Gold-Interaktionen zwischen den Komplexen möglich. [134, 135] Eine Kristallstruktur konnte von den NHC-Au(I)-Alkinen nicht aufgenommen werden, sodass die tatsächliche Konformation der Moleküle nicht bestätigt werden kann.

Komplex	Kurzname	Winkel [°]
20	Im-Methyl-Au-MA	14,6
21	Im-Ethyl-Au-MA	43,8
22	HB-Methyl-Au-MA	33,4
23	HB-Ethyl-Au-MA	47,8
24	MB-Methyl-Au-MA	33,7
25	MB-Ethyl-Au-MA	46,8
26	EB-Methyl-Au-MA	11,4
27	EB-Ethyl-Au-MA	29,7
28	FB-Ethyl-Au-MA	42,7
29	HB-Ethyl-Au-FA	48,0
30	MB-Ethyl-Au-FA	45,3
31	FB-Ethyl-Au-FA	40,0
32	HB-Ethyl-Au-HA	48,7
33	MB-Ethyl-Au-HA	49,3
34	FB-Ethyl-Au-HA	48,8

Tabelle 4 Winkel in ° der NHC-Au(I)-Alkine basierend auf der Aromatenebene der jeweiligen Liganden

Methylsubstituierte Komplexe (20, 22, 24, 26) zeigen einen deutlich kleineren Winkel als die ethylierten Partner der Serie (21, 23, 25, 27), was durch die Größe des Liganden erklärt werden kann. Die Ethylreste ragen weiter in Richtung Zentralatom, sodass der Alkinligand sich nicht mehr so frei im Raum ausrichten kann und sich von der NHC-Ebene wegdreht.

Die Substituenten an 5-Position der NHC-Liganden scheinen ebenfalls Einfluss auf die Positionen der Aromaten zueinander zu haben. Die Wechselwirkungen sind hier von beiden Liganden abhängig und somit komplexer. Die NHC-Liganden scheinen auf die methoxy- und fluorsubstituierten Alkine den gleichen Einfluss zu haben. Die Winkel der Aromaten zueinander werden in folgender NHC-Substituenten-Reihenfolge größer:



Das unsubstituierte Alkin wird durch seine NHC-Partner nur mit einer Winkeländerung unter $0,6^\circ$ beeinflusst.

Auffallend sind zudem die Komplexe **26** und **27**. Der Carbonsäureester scheint die Komplexe insofern zu beeinflussen, als dass die Liganden in einer viel kleineren Verdrehung vorliegen. Die räumliche Ausdehnung des Esters schränkt die freie Beweglichkeit der Stickstoffsubstituenten im NHC ein. Dies wiederum führt zu einer Behinderung des Alkinliganden. Diese Einflüsse scheinen zu einer Konformation zu führen, in der die Aromaten deutlich weniger gegeneinander verdreht vorliegen.

Betrachtet man nun den Alkineinfluss auf die Winkel, erkennt man, dass das unsubstituierte Alkin mit allen NHC-Partnern eine deutlich größere Verdrehung der Liganden zueinander erlaubt als die anderen Alkine. Insgesamt sind sowohl für das unsubstituierte NHC als auch für das unsubstituierte Alkin größere Winkel zu erkennen. Die beiden aromatischen Strukturen unterliegen keiner sterischen Hinderung und können sich frei ausrichten. Für die an 5-Position methoxylierten und fluorierten NHCs lässt sich zudem erkennen, dass das fluoridierte Alkin deutliche kleinere Verdrehungen zulässt als das methoxylierte.

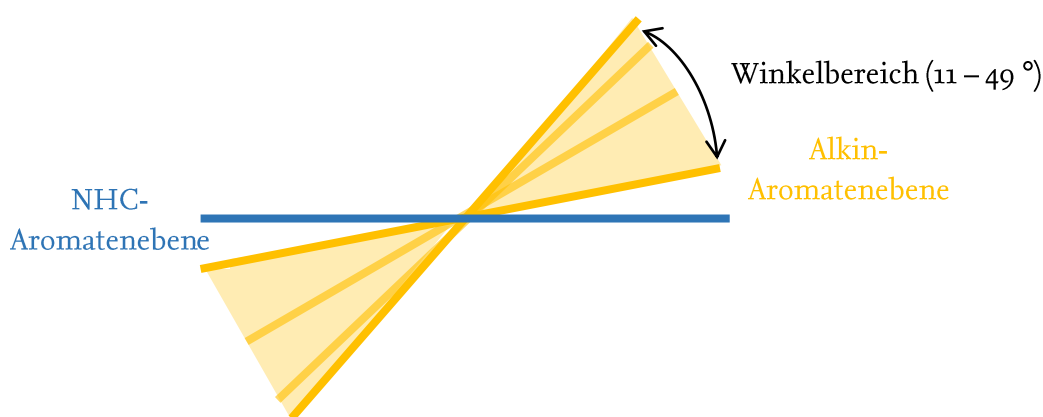


Abbildung 26 Aromatenausrichtung der NHC-Au(I)-Alkine

Zusammenfassend kann aus den Daten geschlossen werden, dass kleine Aromatensubstituenten zu einer stärkeren Verdrehung der Aromaten zueinander führen. Methylreste an den NHC-Stickstoffen nehmen nicht so viel Platz ein und erlauben den Aromaten deshalb sehr flach zueinander vorzuliegen. Eine Besonderheit stellt der Ester in Position fünf der NHCs dar, der zu sehr flachen Winkeln führt.

Die Substituenten an 5-Position des NHCs beeinflussen die Lage der Stickstoffsubstituenten und haben dadurch einen stärkeren Einfluss auf die Winkel als der Alkinsubstituent. Insgesamt ist der Winkel der Aromaten mit einem Maximalwert von $49,3^\circ$ zueinander relativ klein (Abbildung 26).

3.2 Elektrostatische Ladungsverteilung und molekulare Dipolmomente

Die Elektronenwolken der Liganden können in einer Darstellung der elektrostatischen Ladungsverteilung über das ganze Molekül [136–138] zusammengefasst werden, beispielhaft in Abbildung 27 zu sehen. Die Phosphan-Au(I)-Alkine zeigen dabei genauso wie die NHC-Au(I)-Alkine eine negative Ladungsdichte auf der Alkinseite. Vergleicht man NHC- und Phosphanligand, so weisen die NHC-Liganden eine geringere Elektronendichte auf als die Phosphane, sodass auch die gesamte Ladungsverteilung stärker polarisiert ist.

Die Dreifachbindung der Alkine besitzt eine hohe Elektronendichte und ist wie der Chloridoligand von Komplex **14** rot hervorgehoben. Fluor, der Carbonylsauerstoff des Esters und der Sauerstoff der Methoxygruppen haben durch ihre freien Elektronenpaare, verglichen mit dem Rest der Moleküle, ebenfalls eine hohe Elektronendichte. Der Alkinligand erscheint bei allen Komplexen deutlich negativer als der NHC-Ligand, der mit seinen Donoreigenschaften seine Elektronen hin zum Metall schiebt. Durch diese Verteilung entsteht die bereits erwähnte Polarisation, die das molekulare Dipolmoment beeinflusst.

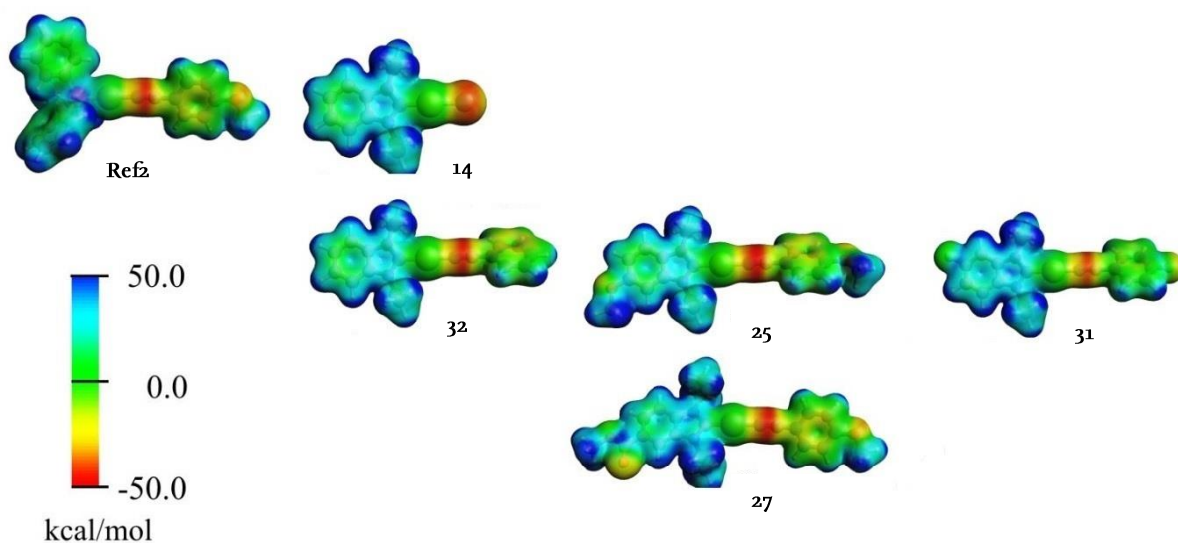


Abbildung 27 Elektronenwolken der Komplexe Ref2, **14**, **32**, **25**, **31** und **27**

Das molekulare Dipolmoment gibt Auskunft über die Reaktivität eines Moleküls. Je größer das Dipolmoment, desto reaktiver ist eine Substanz. Die Dipolmomente der NHC-Au(I)-Alkine sind

in Tabelle 5 zu finden. Die NHC-Au(I)-Alkine scheinen im Durchschnitt ein höheres Dipolmoment zu besitzen, was auf eine höhere Reaktivität im Vergleich zu den Phosphan-Au(I)-Alkinen hindeutet.

Komplex	Kurzname	Dipolmoment [Debyes]
Ref2	TPP-Au-MA	7,09
14	HB-Ethyl-Au-Cl	9,59
16	MB-Ethyl-Au-Cl	10,22
19	FB-Ethyl-Au-Cl	8,02
20	Im-Methyl-Au-MA	8,75
21	Im-Ethyl-Au-MA	8,41
22	HB-Methyl-Au-MA	7,88
23	HB-Ethyl-Au-MA	7,64
24	MB-Methyl-Au-MA	8,84
25	MB-Ethyl-Au-MA	8,51
26	EB-Methyl-Au-MA	7,28
27	EB-Ethyl-Au-MA	7,04
28	FB-Ethyl-Au-MA	6,05
29	HB-Ethyl-Au-FA	10,59
30	MB-Ethyl-Au-FA	11,18
31	FB-Ethyl-Au-FA	8,81
32	HB-Ethyl-Au-HA	8,77
33	MB-Ethyl-Au-HA	9,47
34	FB-Ethyl-Au-HA	7,13

Tabelle 5 Dipolmomente in Debyes der NHC-Au(I)-Alkine, einiger NCH-Au(I)-Cl und Ref2

Innerhalb der ersten Serien zeigen die methylierten Komplexe (20, 22, 24 und 26) durchgängig ein um 0,20 Debyes höheres Dipolmoment als die zugehörigen ethylierten Partner (21, 23, 25 und 27). Da die Ethylsubstituenten das Zentralatom sowohl sterisch als auch induktiv besser vor Reaktionen abschirmen, könnte hier die Erklärung für das kleinere Dipolmoment liegen.

Vergleicht man die NHC-Grundkörper untereinander, so scheint das 5-Methoxybenzimidazol (24, 25, 30 und 33) die größte Reaktivität zu zeigen, gefolgt von Imidazol (20 und 21) und Benzimidazol (22, 23, 29 und 32). Das veresterte Benzimidazol (26 und 27) verliert weiter an Aktivität und das fluorierte Benzimidazol (28, 31 und 34) scheint am wenigsten reaktiv zu sein. Nimmt man die NHC-Au(I)-Chloride (14, 16, 19) dazu, ergibt sich für die NHC-Liganden folgende Reaktivitätsabfolge:



Auf der anderen Seite lassen sich die Alkinliganden in folgende Reaktivitätsabfolge einsortieren:



Der in para-Position fluorierte Alkinligand (29, 30 und 31) zeigt ein deutlich höheres Dipolmoment als seine Partner. Die bereits höhere Elektronendichte des Alkinliganden wird durch das elektronegative Fluor weiter verstärkt, wodurch die Ladungsverteilung zur Alkinseite begünstigt wird und das Dipolmoment zunimmt.

Hieraus ergibt sich, dass Substanz 30, mit 5-Methoxy-NHC und Fluoralkin und einem Dipolmoment von 11,18 Debyes, die reaktivste der gesamten Serie sein sollte. Im Gegensatz sollte Komplex 28 mit 5-Fluor-NHC und Methoxyalkin die geringste Reaktivität zeigen, da er das kleinste Dipolmoment mit 6,05 Debyes aufweist.

Auf der NHC-Seite scheinen Substituenten, die eine positive Polarisierung begünstigen, eine Aktivitätssteigerung hervorzurufen. Genau gegensätzlich verhält es sich auf der Alkinseite, wo eine Erhöhung der Elektronendichte die Reaktivität positiv beeinflusst. Je stärker das gesamte Molekül also polarisiert wird, desto reaktiver sollten die Substanzen sein.

3.3 Bindungsdissoziationsenergien

Die mittlere Bindungsdissoziationsenergie (BDE) beschreibt die Energie, die zur homolytischen Spaltung einer bestimmten Bindung in einem Molekül benötigt wird. Je größer die BDE, desto stabiler ist die entsprechende Bindung. Die BDE wird in dieser Arbeit durch den Betrag der Interaktionsenergie in kcal/mol dargestellt und setzt sich abgeleitet von der Morokuma-Ziegler Energiezerlegungsanalyse (*energy decomposition analysis*, EDA) [139] wie folgt zusammen:

$$\text{BDE} = [\Delta E_{\text{int}}] = [\Delta E_{\text{ion}} + \Delta E_{\text{Pauli}} + \Delta E_{\text{kov}}]$$

BDE = Bindungsdissoziationsenergie [kcal/mol]

ΔE_{int} = Interaktionsenergie

ΔE_{ion} = stabilisierende Energie, ionischer Charakter

ΔE_{Pauli} = abstoßende Energie

ΔE_{kov} = stabilisierende Energie, kovalenter Charakter

Mit Hilfe dieser Berechnungsmethode kann das Zusammenwirken der beteiligten Faktoren gut gezeigt werden. Die oft allein gezeigte ΔE_{Pauli} spiegelt die abstoßende Energie wider, ΔE_{ion} entspricht dem Charakter einer ionischen Bindung und ΔE_{kov} dem einer kovalenten Bindung. Der prozentuale Anteil der stabilisierenden Energien an ihrer Summe zeigt den hauptsächlich vorliegenden Charakter der jeweiligen Bindung. Alle NHC-Au(I)-Alkine zeigen einen ionischen Charakter (ca. 77 % ΔE_{ion}), was in den Eigenschaften der organometallischen Bindung begründet liegt.

Tabelle 6 zeigt die Bindungsdissoziationsenergien für die Komplexe **20** bis **34**. Ein Vergleich zwischen Phosphan- und NHC-Au(I)-Alkine zeigt, dass das Alkin mit einer relativ ähnlichen BDE an das Gold gebunden ist. Das Phosphan scheint etwas leichter vom Gold abspaltbar zu sein als die NHC-Liganden.

Wirft man einen Blick auf die NHC-Au(I)-Alkine untereinander, fällt als erstes der starke Unterschied zwischen den Alkin- und NHC-Liganden auf. Die Alkine scheinen mit Bindungsdissoziationsenergien um 176 kcal/mol deutlich stabiler an das Gold(I)-Zentralatom gebunden zu sein als die NHC-Liganden. Diese zeigen Werte um 70 kcal/mol.

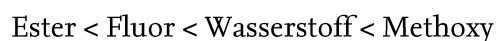
Komplex	Kurzname	BDE Au-NHC	BDE Au-Alkin
Ref2	TPP-Au-MA	54,74	171,77
20	Im-Methyl-Au-MA	69,52	177,81
21	Im-Ethyl-Au-MA	70,35	175,87
22	HB-Methyl-Au-MA	68,91	177,83
23	HB-Ethyl-Au-MA	70,83	172,83
24	MB-Methyl-Au-MA	69,40	175,43
25	MB-Ethyl-Au-MA	71,31	175,03
26	EB-Methyl-Au-MA	68,07	179,39
27	EB-Ethyl-Au-MA	68,74	177,93
28	FB-Ethyl-Au-MA	70,23	179,22
29	HB-Ethyl-Au-FA	71,89	173,79
30	MB-Ethyl-Au-FA	72,40	175,99
31	FB-Ethyl-Au-FA	71,16	175,64
32	HB-Ethyl-Au-HA	71,54	175,23
33	MB-Ethyl-Au-HA	71,54	177,43
34	FB-Ethyl-Au-HA	70,94	177,10

Tabelle 6 BDE [kcal/mol] der NHC-Au(I)-Alkine sowie Ref2 für die NHC- bzw. Phosphan-Au(I)-Bindung und die Alkin-Au(I)-Bindung

Das Alkin wäre somit der Ligand, der deutlich stabiler an das Gold(I) bindet und bei Reaktion erst als zweites abgespalten wird.

Die am NHC-Stickstoff methylysubstituierten Komplexe (20, 22, 24 und 26) scheinen im Durchschnitt etwas lockere Bindungen zwischen NHC und Gold(I) zu zeigen, was ebenfalls zu den Ergebnissen für die Bindungslängen passt.

Für die verschiedenen NHC-Substituenten an 5-Position nimmt die Stärke der NHC-Au(I)-Bindung mit folgender Tendenz zu:



Betrachtet man für die NHC-Gold-Bindung den Alkinsubstituenteneinfluss, zeigt sich eine Umkehrung der Reihenfolge:



Diese Ergebnisse passen ebenfalls zu den Reaktivitäten, die sich durch die Dipolmomente ergeben. Die Bindung zwischen Gold und Alkin scheint keinem eindeutigen Einfluss zu unterliegen, was wahrscheinlich an der Dreifachbindung liegt, die mögliche Effekte abfängt.

Die errechneten Parameter beinhalten eine große Datenmenge, die hilft, die Chemie der NHC-Au(I)-Alkine besser zu verstehen. Der Vergleich der berechneten Eigenschaften mit den Laborergebnissen bietet viele Interpretationsmöglichkeiten und Schlussfolgerungen. Eine Zusammenfassung dieser Daten und der Vergleich mit den gemessenen Laborergebnissen finden sich in den Kapiteln 4.2, 4.3, 5.1, 5.5 und 7.1.

4 Synthese der Gold(I)-Komplexe

In den folgenden Abschnitten (Kapitel 4.1, 4.2, 4.3) wird die Syntheseentwicklung der neuen Komplexklasse gezeigt und anschließend eine Übersicht über die chemische Komplexcharakterisierung gegeben. Kapitel 4.4 befasst sich zugehörig zum zweiten Themenbereich (siehe Kapitel 2.3) der Arbeit mit der Optimierung der Phosphan-Au(I)-Alkin-Synthese.

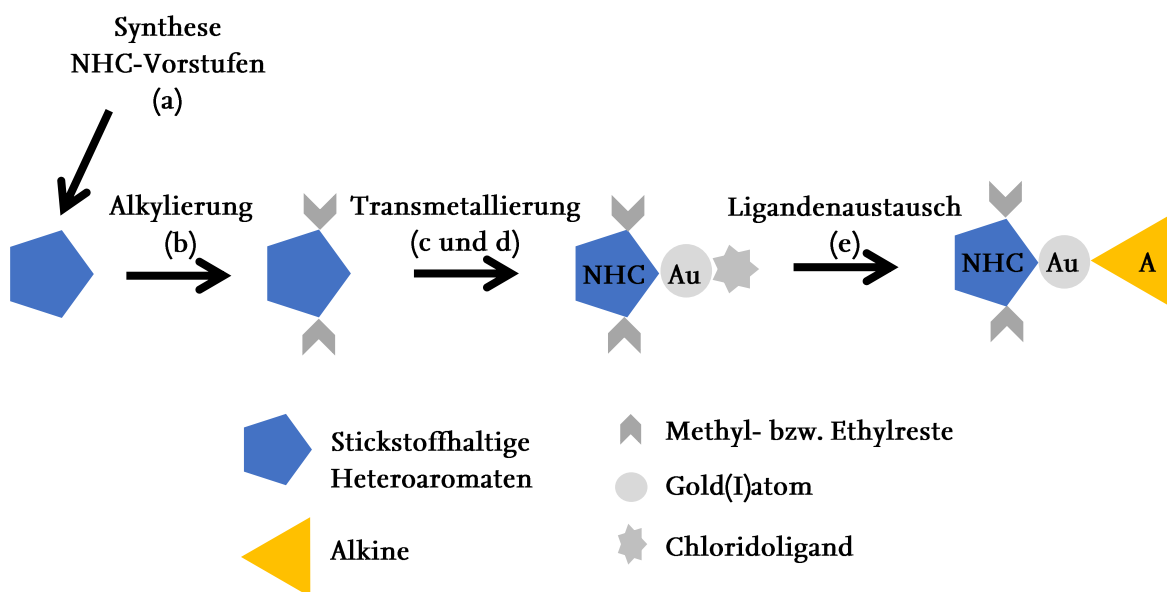


Abbildung 28 Übersicht über die Synthese der NHC-Au(I)-Alkine mit den einzelnen Teilschritten

Die NHC-Au(I)-Alkine werden in drei separaten Hauptschritten synthetisiert, wobei zum einen etablierte Methoden verwendet und angepasst werden, zum anderen wird ein neuer Syntheseweg für NHC-Au(I)-Alkine erschlossen. Abbildung 28 gibt eine schematische Übersicht über die Komplexsynthese.

Bis auf das 5-Fluor-1*H*-benzimidazol konnten alle NHC-Vorstufen käuflich erworben werden. Diese werden in einem ersten Schritt an beiden Stickstoffen methyliert bzw. ethyliert (Alkylierung, b). Die so entstandenen Kationen werden in einer Eintopfreaktion mit Silberoxid einer Metallierung unterzogen (c), woraufhin direkt im Anschluss eine Transmetallierung (d) mit Chlorido(dimethylsulfid)gold(I) erfolgt. Das komplexierte Silber wird hierbei durch Gold ausgetauscht. Erst bei der Metallierung und Transmetallierung, die im Folgenden unter Transmetallierung zusammengefasst werden, entsteht das *N*-heterozyklische Carben. Zur leichteren Übersicht werden die Imidazole und Benzimidazole schon vorher mit NHC abgekürzt. Die NHC-Au(I)-Cl-Komplexe werden abschließend einem Ligandenaustausch (e)

unterzogen. Bei diesem wird der Chloridoligand des Zentralatoms gegen das Zielalkin ausgetauscht.

Die Gewinnung der Zielkomplexe über eine Alkin-Au(I)-Zwischenstufe anstelle des NHC-Au(I)-Cl wurde ebenfalls in die Überlegungen zu möglichen Synthesewegen einbezogen. [140–142] Es ist möglich, Alkin-Au(I)-Halogenide herzustellen, die Synthese ist aber deutlich komplexer und erfordert Reaktionsbedingungen, die vor Ort nicht ohne weiteres umgesetzt werden können. Gleichzeitig zeigen die BDE der Komplexe (siehe Kapitel 3.3), dass der Alkinligand evtl. stabiler an Gold(I) bindet, sodass der letzte Schritt des Ligandenaustausches aus dem NHC-Au(I)-Cl mit größerer Wahrscheinlichkeit umsetzbar wäre. Des Weiteren ist die Synthese von NHC-Au(I)-Chloriden im Arbeitskreis gut etabliert und alle benötigten Reagenzien und Gerätschaften sind vorrätig.

Aufgrund dieser Gegebenheiten wurde entschieden, die NHC-Au(I)-Alkine ausgehend von den NHC-Vorstufen über eine NHC-Au(I)-Cl-Zwischenstufe bis zum NHC-Au(I)-Alkin mittels Ligandenaustausch als Endprodukt zu erschließen.

Im Vergleich zu den ersten Syntheseschritten war für den Ligandenaustausch die Entwicklung einer neuen geeigneten Synthesemethode erforderlich. Die Anpassung der bekannten Methoden an die Liganden und die Neuentwicklung des letzten Syntheseschritts wird im Folgenden beschrieben. Die Mechanismen der Reaktionen werden am Beispiel von Komplex **23** (1,3-Diethylbenzimidazol-2-yliden)(2-(4-methoxyphenyl)-ethynyl)gold(I) (siehe Abbildung 29) erklärt und sind für alle anderen Komplexe übertragbar.

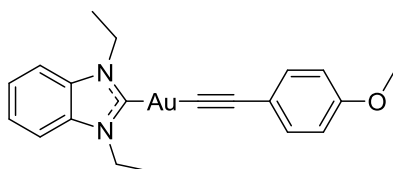


Abbildung 29 Komplex 23 als Beispiel für die Syntheseschritte und Mechanismen

4.1 Syntheseoptimierung

Zu Beginn werden die etablierten Methoden des Ringschlusses, der Alkylierung und Transmetallierung an die Liganden angepasst und optimiert.

Die Synthese des 5-Fluor-1*H*-benzimidazols (**1**) wird über eine sauer katalysierte nukleophile Substitution an Ameisensäure realisiert (siehe Abbildung 30) und kann durch Ansäuern mit 5 M Salzsäure optimiert werden. Der Ringschluss (a) von 1,2-Diamino-4-fluorbenzol mit Ameisensäure wird durch die zusätzliche Mineralsäure begünstigt, sodass sich eine höhere Ausbeute erzielen lässt. Die überschüssige Säure kann am Ende mit Ammoniak neutralisiert werden. Das Ausschütteln des Reaktionsansatzes mit Ethylacetat (EtOAc) führt zu einer enormen Zeitersparnis und vereinfacht die Aufreinigung im Vergleich zur Trocknung des wässrigen Ansatzes und Auswaschen mit Dichlormethan (DCM). Mit Ausbeuten von 80 – 88 % und der Aufreinigung über Extraktion ist der Ringschluss dieser Substanz ohne Katalysatoren oder spezielle Methoden, wie der Mikrowellensynthese, effizienter als die vorher genutzten Methoden. [143–147]

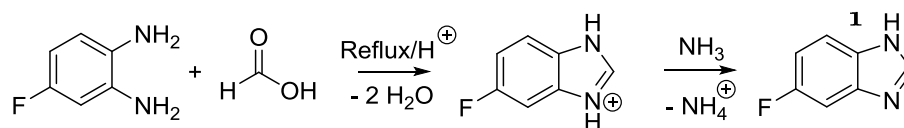


Abbildung 30 Ringschluss (a) zum 5-Fluor-1*H*-benzimidazol (**1**)

Die Alkylierungsreaktion (b) ist stark von den genutzten Heteroaromaten abhängig. Die im Arbeitskreis etablierte Methode musste deshalb an die jeweiligen Liganden angepasst werden, da mit dem Standardverfahren nicht immer eine ausreichende Ausbeute erzielt werden konnte. Alle Heteroaromaten können durch eine längere Reaktionszeit und durch eine größere Menge des Alkylierungsmittels im ersten Syntheseschritt mit konstant hohen Ausbeuten alkyliert werden. Von Vorteil erweist sich auch, die leicht flüchtigen Alkylierungsmittel nicht komplett am Anfang der Reaktion dazuzugeben, sondern mehrmals je 2,0 Äquivalente dazu zu pipettieren. Die Ansatzgröße zeigt ebenfalls einen Einfluss auf die Reaktionszeit. Kleine Ansätze für z.B. 50 mg waren teilweise schon über Nacht durchreagiert, während Reaktionen mit 1,0 g als Ziel mehrere Tage reagieren mussten. Für alle Reaktionen wird Acetonitril als Lösemittel, Kaliumcarbonat als Base und Tetrahydrofuran (THF) im letzten Aufreinigungsschritt verwendet.

Für die Reaktion (siehe Abbildung 31) wird die jeweilige Ausgangssubstanz und 1,2 Äquivalente Kaliumcarbonat in Acetonitril suspendiert, dies führt zu einer Stickstoffdeprotonierung. Zu dem Ansatz werden 2,0 Äquivalente Alkylierungsmittel pipettiert. Das Reaktionsgemisch wird unter Rühren zum Rückfluss (85 °C) erhitzt, wobei ein negativ geladener Stickstoff nukleophil am verwendeten Iodalkan unter Iodidabspaltung angreift. Nach einigen Stunden werden zwei weitere Äquivalente zu dem Ansatz gegeben und die Reaktion durch Kieselgel-Dünnschichtchromatographie (DC) und Ethylacetat als Fließmittel verfolgt.

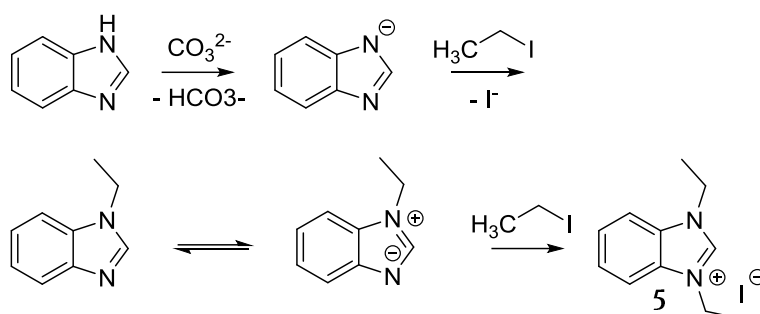


Abbildung 31 Alkylierung (b) am Beispiel der Ethylierung von Benzimidazol zu Substanz 5

Nach kompletter Umsetzung, also wenn durch den zweiten Stickstoff ein weiterer nukleophiler Angriff an einem zweiten Iodalkan stattgefunden hat, wird das Acetonitril unter Vakuum entfernt und der Ansatz in DCM resuspendiert und filtriert. Überschüssige Base und andere wasserlösliche Salze werden dabei entfernt. Das DCM wird unter Vakuum entfernt. Der entstandene Feststoff mit THF gewaschen und getrocknet. Lösemittelreste werden in der Trockenpistole (Vakuum, 50 °C) rausgetrocknet. Eine Zusammenfassung der geänderten Reaktion und Aufreinigung findet sich in Tabelle 7.

	Alt	Neu
Reaktionszeit	8 - 24 h	14 - 48 h
Äq. Alkylierungsmittel	3 Äq.	2 x 2 Äq.
Äq. K ₂ CO ₃	1 Äq.	1,2 Äq.
Ausbeuten allgemein	0 - 90 %	28 - 96 %
Substanz 5	90,0 %	95,6 %

Tabelle 7 Reaktionsbedingungen und Ausbeuten im Vergleich vor und nach der Anpassung

Bei der Transmetallierung (c und d) [148–150] kann die Reaktionszeit mit Silberoxid verkürzt werden. Die Umsetzung des Kations mit Silberoxid ist visuell durch das Lösen des schwarzen Silberoxids gut sichtbar und je nach Ansatzgröße schon nach 30 Minuten abgeschlossen. Nach Zugabe des Chlorido(dimethylsulfid)gold(I) findet die Transmetallierung direkt statt und Silberiodid fällt aus. Die Reaktionszeit wird in diesem Schritt jedoch von 10 h auf 24 - 48 h erhöht,

bis auch über DC eine vollständige Umsetzung zum gewünschten NHC-Au(I)-Cl nachgewiesen werden kann. Ein Austausch des Gold-Agens zu Chlorido(tetrahydrothiophen)gold(I) oder dem Gold(III)-Salz $\text{NaAuCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und gleichzeitiger Reduktion brachte keinen Vorteil gegenüber der Standardmethode. [151–153] Ein Überschuss der NHC-Vorstufe erhöht ebenfalls nicht die Ausbeute. Bei diesen Reaktionsansätzen kann es zu einer ungewollten Dimerbildung kommen, bei der ein Goldatom mit zwei NHC-Molekülen reagiert und Iodid oder Chlorid im Gemisch als Gegenionen auftreten. Beide Reaktionsschritte der Eintopfreaktion sind in Abbildung 32 zu sehen, die Änderung der Reaktion in Tabelle 8.

	Vorher	Nachher
Reaktionszeit Ag_2O	2 h	30 min - 1 h
Äquivalente Silberoxid	0,5	0,6
Reaktionszeit Transmetallierung	max. 10 h	24 - 48 h
Ansatzgröße	max. 50 mg	200 mg
Ausbeuten	~ 30 %	27 - 87 %

Tabelle 8 Reaktionsbedingungen der Transmetallierung vor und nach der Überarbeitung

Zusätzlich lässt sich für beide Syntheschritte sagen, dass größere Ansätze höhere Ausbeuten liefern, da bei gleichen Geräten und z.B. Celite®-Mengen der Verlust prozentual gesehen kleiner wird. Für beide Synthesen geht eine größere Ansatzmenge mit einer längeren Reaktionszeit einher. Insgesamt können jetzt Ausbeuten von 27 - 87 % erzielt werden, wobei die Reaktion unter Lichtausschluss erfolgen muss.

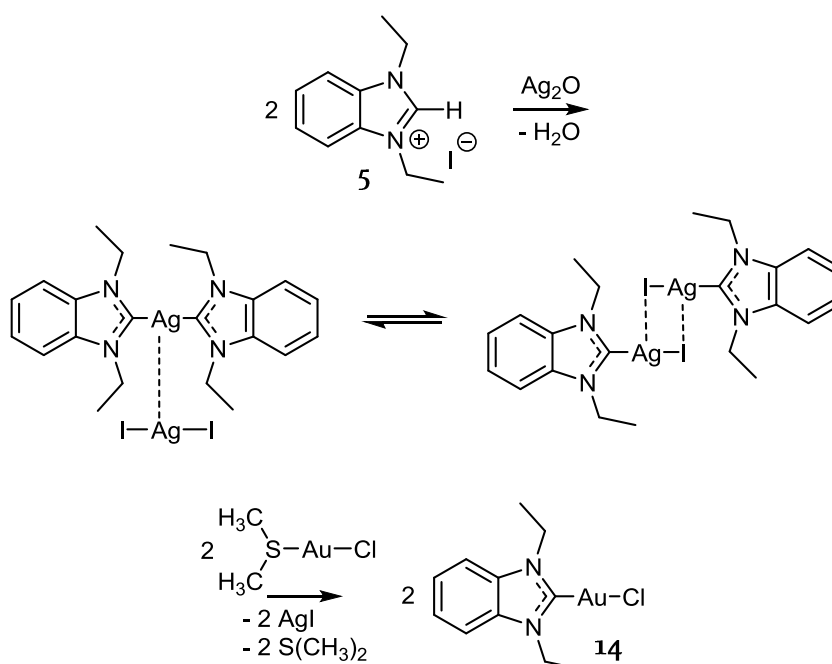


Abbildung 32 Kopplung von Substanz 5 mit Silberoxid und anschließende Transmetallierung mit Gold(I) zu Komplex 14

Für die Reaktion (siehe Abbildung 32) wird das jeweilige Iodidsalz mit 0,6 Äquivalenten Silberoxid in DCM gelöst und unter Lichtschutz bis zur vollständigen Farbänderung (schwarzes Silberoxid löst sich) gerührt. Hier bildet sich unter Wasserabspaltung eine instabile Zwischenstufe. [149, 154] 1,0 Äquivalent Chlorido(dimethylsulfid)gold(I) wird zu dem Ansatz gegeben und die Reaktion so lange unter Lichtschutz gerührt, bis über Kieselgel-DC und EtOAc als Fließmittel die vollständige Umsetzung der freien Liganden mit Gold nachweisbar ist. Der Ansatz wird über Celite® gefiltert und mit DCM so lange nachgewaschen, bis das Filtrat keine Farbe mehr aufweist oder die Säule mehrmals komplett gespült wurde. Das entstandene Dimethylsulfid ist leicht flüchtig und Silberiodid ist unlöslich in DCM, sodass es im Celite®-Filter verbleibt. Das DCM wird unter Vakuum entfernt und die Substanz in der Trockenpistole getrocknet.

4.2 Syntheseentwicklung für Ligandenaustausch

Wie bereits beschrieben soll die NHC-Au(I)-Alkin-Synthese über die NHC-Au(I)-Cl-Zwischenstufe realisiert werden (siehe Abbildung 33). Für den Ligandenaustausch stellte sich als erstes die Frage nach einem geeigneten Lösemittel. Das Alkin sollte über eine Deprotonierung [155, 156] aktiviert werden, sodass ein Lösemittel nötig ist, in dem verschiedene Basen löslich sind, eine Deprotonierung möglich ist, aber auch die verwendeten Alkine und NHC-Au(I)-Cl-Komplexe in Lösung gehen.

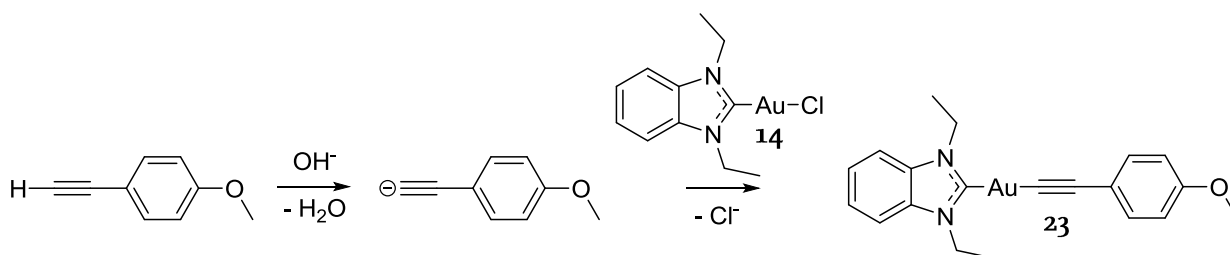


Abbildung 33 Ligandenaustausch am Beispiel von Komplex 23

Methanol als polares organisches Lösemittel wird als erstes ausprobiert, da es alle drei Anforderungen erfüllt. Bei Löslichkeitsproblemen wird zu dem Reaktionsansatz tropfenweise DCM gegeben, bis die Edukte gelöst sind. Auf diese Weise lassen sich alle Reaktionspartner in Lösung bringen. Da in ersten Versuchen Komplex 23 in Methanol hergestellt werden konnte, wird keine weitere Lösemittelkombination untersucht. Während der Entwicklungsphase wird der Syntheserfolg mittels DC und wenn möglich mittels ^1H -NMR kontrolliert.

Während der Methodenentwicklung ist aufgefallen, dass sich die Komplexe durch Kieselgel zu zersetzen scheinen. Kieselgel, mit seinem leicht sauren Charakter, scheint für NHC-Au(I)-Alkine nicht zur Detektion und Aufreinigung geeignet zu sein. Die Komplexe bleiben auch bei hohen pH-Werten stabil, zeigen aber eine deutliche Instabilität gegenüber Säuren. Dies ermöglicht zum einen die Umsetzung mit Alkinen in alkalischem Milieu, führt jedoch zu den erwähnten Problemen bei zum Beispiel Standard-DCs. Aluminiumoxid (AlOx) bietet für säurelabile Substanzen eine Alternative zu Kieselgel und kann je nach Wassergehalt verschiedene Aktivitäten (nach Brockmann [157]) und Eigenschaften annehmen (siehe Tabelle 9).

Aktivitätsstufe	Wassergehalt [%]	Anwendungsgebiet
Super I	0	Lösemitteltrocknung
I	~ 0	Lösemitteltrocknung
II	3	Chromatographie
III	6	Chromatographie
IV	10	Chromatographie
V	15	Chromatographie

Tabelle 9 Einstufung der AlOx-Aktivität nach Brockmann

Die ersten Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie mit Kieselgel als stationäre Phase und die dazugehörigen NMR-Daten zeigten widersprüchliche Ergebnisse. Untersuchungen der Reaktionsansätze mit Kieselgel-DC zeigen keine Umsetzung der eingesetzten Edukte bzw. Flecken, die auf Zersetzungsprodukte hinweisen. Im Gegensatz dazu lassen sich in den dazugehörigen NMR-Spektren Produktsignale finden. Wegen dieser Widersprüche können daraus Schlussfolgerungen nur schwer gezogen werden. Diese Ergebnisse werden deshalb nicht aufgeführt oder weiter diskutiert. Um einen möglichen Zerfall auszuschließen, wird für die weitere Methodenentwicklung des Ligandenaustauschs AlOx als stationäre Phase für Dünnschicht- und Säulenchromatographie verwendet.

Anfangs werden die Ansätze bei Raumtemperatur gerührt, um die NHC-Au(I)-Cl nicht zu zerstören. [91, 106] Bei keiner der verwendeten Basen oder Reaktionszeiten kann mittels DC eine relevante Umsetzung beobachtet werden. Die getesteten Basen sind K₂CO₃, KOH und NaOH. Reaktionszeiten bis zu vier Tagen geben keinen Hinweis auf eine Reaktion der Edukte.

Eine weitere Idee war, das NHC-Au(I)-Cl zu aktivieren. Hierbei soll der Chloridoligand durch Silber abgefangen werden. Mit verschiedenen Silbersalzen (Ag_2O , AgNO_3) wird parallel zur Alkindeprotonierung das NHC-Au(I)-Cl unter Stickstoffatmosphäre in DCM gelöst und dann werden beide Ansätze zusammengebracht. Diese Ansätze zeigen jedoch Nebenreaktionen und können nicht ausreichend aufgereinigt werden, sodass kein Zielprodukt gefunden werden kann.

Die Ansätze werden daraufhin zum Rückfluss erhitzt. Zuerst wird das Alkin unter Rückfluss deprotoniert und anschließend die Wärmezufuhr gestoppt und das NHC-Au(I)-Cl dazugegeben. Der Ansatz mit KOH zeigt neue Flecken in der DC, die auf eine Umsetzung hindeuten (siehe Abbildung 34). Die Alkine sind relativ leicht flüchtig und zeigen sehr große verschwommene Flecken. Mit dem genutzten Fließmittel wandert das Produkt (Komplex 23) minimal weiter als das NHC-Au(I)-Cl (14).

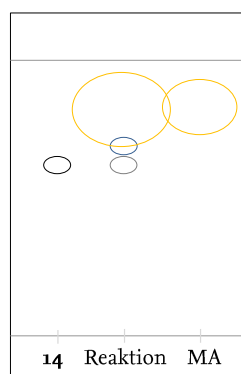


Abbildung 34 Schematisches Bild der AlOx DC-Platte mit EtOAc/Hexan (12u1) als Fließmittel, Komplex 14 grau, MA gelb, Komplex 23 blau

Nach Entfernung des Methanols wird der Ansatz in Dichlormethan resuspendiert und filtriert, die ^1H -NMR zeigt neben den Eduktpeaks neue leicht verschobene Signale. Die Reaktion scheint somit erfolgreich abzulaufen, aber das gewonnene Pulver enthält noch Eduktreste, sodass die Komplexe einer Aufreinigung unterzogen werden müssen.

Da die NHC-Au(I)-Cl keine Zersetzung unter den erhöhten Temperaturen zeigen, wird im Folgenden die gesamte Reaktion unter Rückfluss durchgeführt. [158] Hierfür wird das Alkin 30 Minuten deprotoniert und das NHC-Au(I)-Cl danach dazugegeben, nach zwei Stunden wird der Ansatz weiter verarbeitet.

Hierzu wird säulenchromatographisch aufgereinigt, auskristallisiert und die Extraktion mittels Ausschütteln durchgeführt. [107] Bei einer Ansatzgröße von 25 mg kann für die Methoden nicht genug Endprodukt gewonnen werden, weshalb die Ansatzgröße auf 50 mg erhöht wird.

Zur Auskristallisation wird der Ansatz analog zu den Phosphan-Au(I)-Alkinen mit Hexan versetzt und 72 h bei -20 °C aufbewahrt. Diese Methode führt zu keiner ausreichenden und selektiven Fällung.

Für die Säulenchromatographie wird, wie bereits erklärt, neutrales AlOx (Aktivität 2 bis 3) als stationäre Phase verwendet. Als mobile Phase zeigte sich bei der Dünnschichtchromatographie ein Hexan/EtOAc-Gemisch im Verhältnis 1 zu 1 als beste Variante. Der Reaktionsansatz wird eingengt und im Fließmittel gelöst. Da die Komplexe keine starke Färbung aufweisen und AlOx auf DC-Platten und als Säulenmaterial eine leicht andere Aktivität besitzt, ist die Aufreinigung sehr langsam und unter ständiger DC-Kontrolle durchzuführen. Es können verschiedene Fraktionen isoliert werden, die nach Trocknung und ¹H-NMR die beiden Edukte und den Zielkomplex enthalten. Die Ausbeute liegt hier bei 13 %, was bei einer Ansatzgröße von 50,0 mg 6,5 mg Produkt entspricht und somit nur für die analytische Untersuchung reicht.

Die Aufreinigung durch Ausschütteln erfolgt mit DCM und Wasser. Der Ansatz wird eingengt und in DCM resuspendiert. Das DCM wird dreimal mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingengt. Die Charakterisierung mittels ¹H-NMR zeigt, dass der Zielkomplex mit geringen Verunreinigungen vorliegt, die Ausbeute liegt bei 34 %.

Der Syntheseweg mit Energiezufuhr und die Aufreinigung durch Ausschütteln erweisen sich als beste Methoden zur NHC-Au(I)-Alkin Herstellung, zeigen jedoch noch Optimierungspotential.

Zur Alkindeprotonierung werden deshalb nochmals verschiedene Basen ausprobiert: Kaliumcarbonat, Kaliumhydroxid, Natriumhydroxid und Tetrabutylammoniumhydroxid (TBAH). Mit Kaliumcarbonat kann kein erfolgreicher Ligandenaustausch erzeugt werden. TBAH zeigt schwarze Reaktionsansätze, die sich nicht vollständig trennen lassen. KOH und NaOH zeigen beide eine gute Umsetzung. Aufgrund der erfolgreichen Nutzung in der Phosphan-Au(I)-Alkin-Synthese und der leichteren Handhabung wird für alle folgenden Versuche und Reaktionen KOH verwendet.

Verschiedene Äquivalente der Base werden erprobt (1, 3, 7, 10 Äq.), wobei sich zeigt, dass eine zu kleine Menge Base keine ausreichende Reaktion hervorruft. Ab einer Menge von 7,0 Äquivalenten kann kein verbessernder Einfluss auf die Reaktion beobachtet werden, sodass 7,0 Äquivalente für alle weiteren Versuche ausgewählt werden. Während dieser Versuchsreihe zeigt sich ebenfalls, dass eine Reaktionszeit von 10 bis 15 min für eine vollständige Deprotonierung ausreicht.

Ein leichter Überschuss des Alkins (1,2 Äq.) erweist sich ebenfalls als vorteilhaft, um das gesamte NHC-Au(I)-Cl umzusetzen. Der Überschuss wird während des Ausschüttelns entfernt. Bei Rückständen kann ein weiterer Extraktionsschritt mit alkalisiertem Wasser erfolgen. Größere Mengen Alkin (1,5 Äq. und 2 Äq.) zeigen keine Verbesserung der Ausbeute.

Die Phasentrennung während des Ausschüttelns erweist sich als deutlich klarer, wenn der in DCM resuspendierte Ansatz durch einen Papierfilter gegeben wird.

Die Reaktionszeit mit NHC-Au(I)-Cl ist relativ variabel und abhängig von den verwendeten Vorstufen. Kleine Ansätze sind für einige Komplexe schon nach einer Stunde umgesetzt, aber eine längere Reaktionszeit scheint bei den meisten Komplexen die Ausbeute nicht zu verringern oder zur Zersetzung zu führen.

Die erfolgreiche Synthese der NHC-Au(I)-Alkine wird nachstehend mit allen Einzelschritten und Bedingungen beschrieben.

1,2 Äquivalente Alkin werden in Methanol (ca. 10 ml) gelöst, mit 7,0 Äquivalenten KOH versetzt und mindestens 10 min zum Rückfluss erhitzt (65 °C). Danach wird ein Äquivalent NHC-Au(I)-Cl zum Ansatz gegeben und bei Löslichkeitsproblemen DCM bis zum vollständigen Auflösen der Edukte hinzu getropft. Der Ansatz wird je nach Liganden 1 h bis 96 h zum Rückfluss erhitzt. Nach erfolgreicher Umsetzung wird das Methanol entfernt, der Ansatz in DCM resuspendiert und durch einen Papierfilter in einen Schütteltrichter gegeben. Nach dreimaligem Waschen der organischen Phase mit Wasser und Trocknen mit Na_2SO_4 , wird das DCM entfernt und das Produkt in der Trockenpistole getrocknet. Die so durchgeführte Reaktion führt je nach Komplex zu Ausbeuten im Bereich von 15 bis 70 %. Der entwickelte Syntheseweg wird im Arbeitskreis

etabliert und lässt sich auf verschiedene NHCs und Alkine übertragen. Die Synthese von Phosphan-Au(I)-Alkinen ist auf diesem Weg ebenfalls möglich.

Eine Übersicht über die getesteten Reagenzien und Reaktionsbedingungen ist nachfolgend aufgeführt (siehe Abbildung 35).

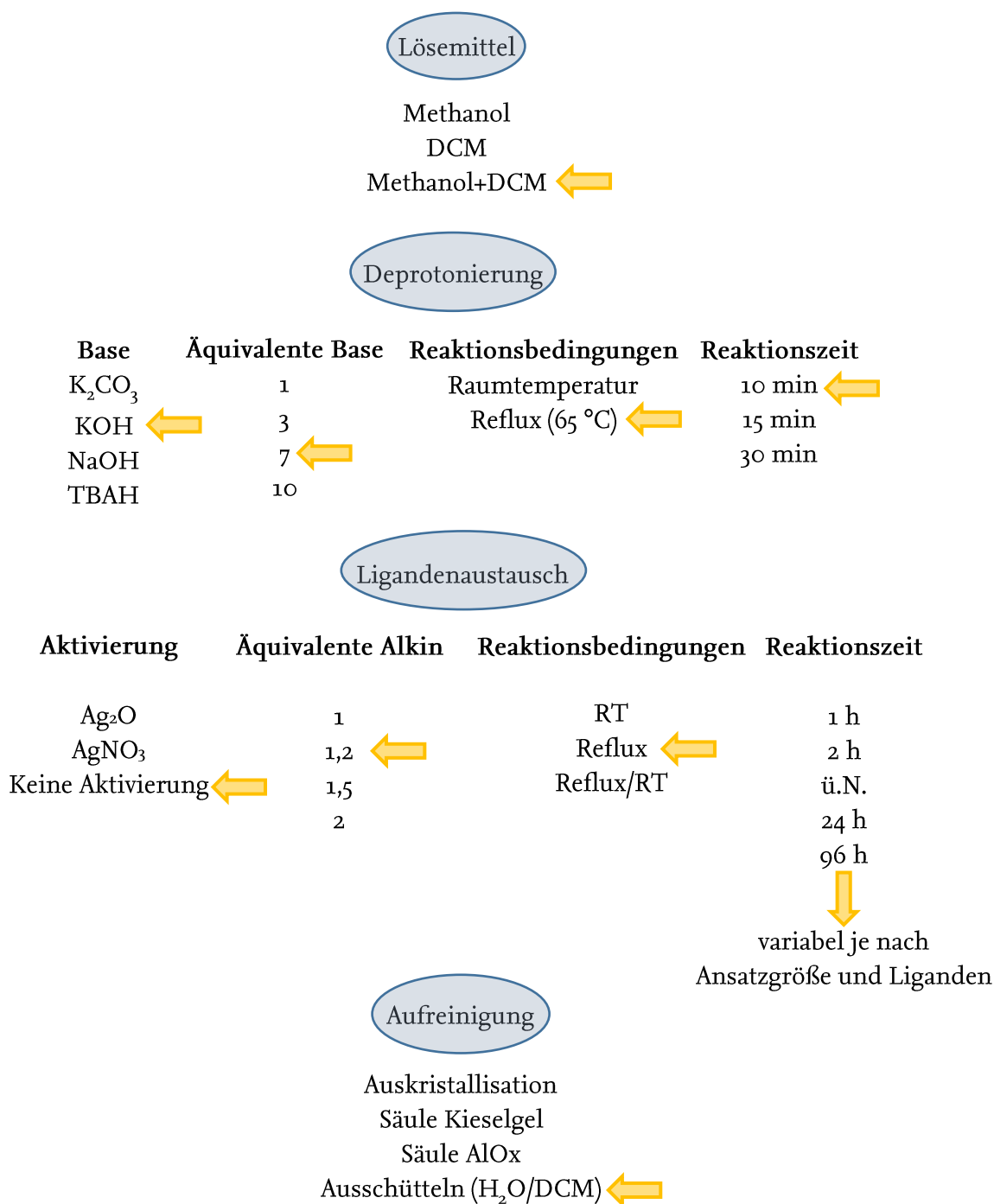


Abbildung 35 Übersicht der Reagenzien und Bedingungen während der Syntheseentwicklung für den Ligandenaustausch, gelbe Pfeile markieren die besten Methoden

4.3 Chemische Charakterisierung der NHC-Au(I)-Alkine

Die erfolgreiche Synthese und Reinheit einer Substanz muss mit verschiedenen analytischen Methoden nachgewiesen werden. Dabei gibt es substanzspezifische Regelmäßigkeiten und Besonderheiten, die auf den folgenden Seiten beschrieben werden.

Die synthetisierten Vorstufen und Komplexe werden mittels ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, ^{19}F -NMR, Elementaranalyse und Massenspektrometrie charakterisiert und auf ihre Reinheit überprüft. Bei biologischen Untersuchungen verfälschen Verunreinigungen zum einen die Einwaagen und somit die folgenden Konzentrationen und zum anderen die Ergebnisse selbst, sodass für jedes Element für die Elementaranalyse eine maximale Abweichung von 0,5 % angestrebt wird.

Da die Komplexe meist weiß bis beige gefärbt sind, ist das Aussehen nicht spezifisch genug, um bei der Identifizierung zu helfen. Einige freie Alkine weisen einen charakteristischen Geruch auf, die getrockneten Komplexe müssen dementsprechend frei von diesem sein.

Die hergestellten Substanzen sind in Kapitel 8.5 beschrieben, die Synthesebedingungen und die genaue Charakterisierung befinden sich ebenfalls dort. Im Folgenden werden spezifische Eigenschaften der Komplexe in der NMR-Analytik und Massenspektrometrie aufgezeigt.

Die Kernresonanzspektroskopie bietet vielseitige Möglichkeiten zur Charakterisierung von chemischen Substanzen. Durch die Messbarkeit der ^1H -, ^{13}C - und ^{19}F -Kerne lassen sich die hergestellten Komplexe gut untersuchen, wobei chemische Verschiebung und Aufspaltungsmuster charakteristischen Änderungen durch Substitution und Komplexierung unterliegen.

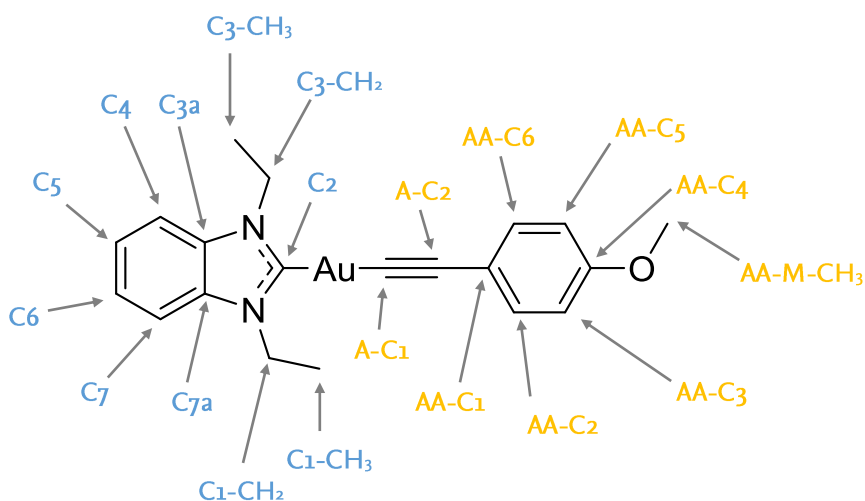


Abbildung 36 Komplex 23 mit Positionsnummern bzw. Kürzeln (vereinfacht und nicht nach IUPAC), blau die NHC-Atome und gelb die Alkinatome

Der nachfolgende Abschnitt dieser Arbeit befasst sich mit der Analytik der neuen Substanzklasse der NHC-Au(I)-Alkine und zeigt Besonderheiten innerhalb in der ^1H - und ^{13}C -NMR. Um die Zuordnung der Signale zu vereinfachen, sind in Abbildung 36 die einzelnen Positionen mit einem Kürzel gekennzeichnet. Für einen ersten Überblick ist in Abbildung 37 das ^1H -Spektrum von Komplex **23** und die Zuordnung der Signale abgebildet. Der Synthesefortschritt wird ebenfalls an Komplex **23** erklärt.

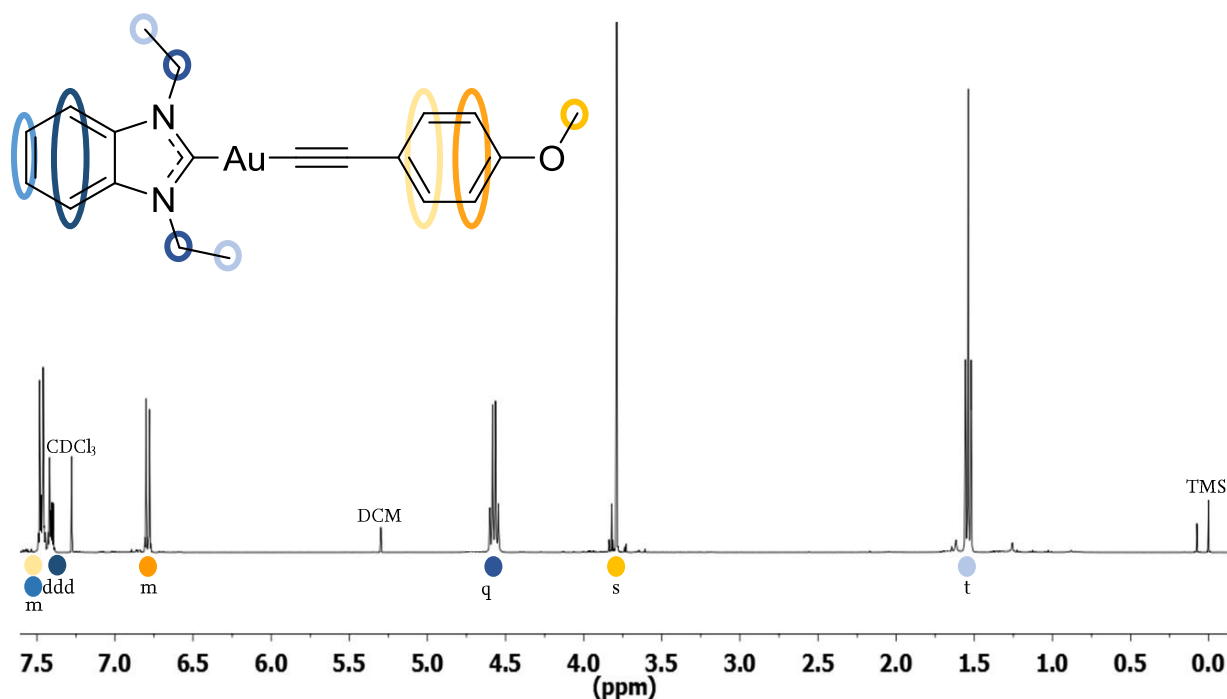


Abbildung 37 ^1H -NMR von Komplex **23**

Alle Schritte der Komplexsynthese sind durch eine signifikante Änderung in den Spektren gut zu verfolgen (siehe Tabelle 10). Die Substanzen werden, wenn nicht anders erwähnt, in deuteriertem Chloroform (CDCl_3) gelöst. Das Lösemittelsignal ist somit bei 7,26 ppm und ein mögliches Wassersignal bei 1,56 ppm zu finden. [159]

Reaktion	^1H	^{13}C
Alkylierung (b)	NH-Signal verschwindet Alkylsignale erscheinen Protonen verschoben	Alkylsignale erscheinen
Trans-metallierung (c+d)	Carbensignal von C2 verschwindet	Carbensignal verschoben Carbensignal verschwindet (DEPT)
Liganden-austausch (e)	Alkinsignal von A-C1 verschwindet Substituentensignale erscheinen Zusätzliche Aromatenpeaks erscheinen	Alkinsignal verschoben Alkinsignal verschwindet (DEPT) Substituentensignale erscheinen Zusätzliche Aromatenpeaks erscheinen

Tabelle 10 NMR-Veränderungen zur Reaktionsverfolgung

Es ist zu beachten, dass die chemische Verschiebung von den Substituenten an 5-Position der NHCs und vom para-Substituenten des Alkins beeinflusst wird. Bei unsubstituierten NHC-Liganden erscheinen Position C₄ und C₇, C₅ und C₆ sowie die C₁- und C₃-Reste meistens jeweils in einem Peak mit größerem Integral. Das Alkin verhält sich ähnlich, da AA-C₂ und AA-C₆ sowie AA-C₃ und AA-C₅ jeweils zusammen in einem Signal erscheinen.

Die NHCs werden durch eine Substitution (Methoxy, Ester und Fluor) an 5-Position unsymmetrisch, was das Aufspaltungsmuster der Aromatenprotonen und Stickstoffsubstituenten beeinflusst. Ohne 2D-NMR lassen sich die Protonen- und Kohlenstoffsignale nicht immer eindeutig zuordnen. Für die Methyl- und Ethylreste der Stickstoffsubstituenten sind zum Teil zwei Singulets bzw. zwei Quartetts und Triplets zu sehen, die um 0,1 bis 0,3 ppm auseinander liegen. Für die ¹³C-Ergebnisse ist der Signalabstand ähnlich. Die Kohlenstoffe der NHC-Aromaten an Position C₄, C₆ und C₇ lassen sich für ihre Protonen durch die Kopplungskonstanten meistens einfach zuordnen. C₆ und C₇ koppeln über eine Bindung mit einer Konstante von ca. 9 Hz miteinander. Das weiter entfernte C₄ koppelt mit C₆ mit einer Kopplungskonstante um 2,0 Hz und mit C₇ mit einer um 0,5 Hz. Durch die unterschiedlichen Eigenschaften der Reste an 5-Position verschieben sich die Signale zudem. Für die Kohlenstoffsignale der drei Positionen ist dies ähnlich. Die jeweiligen Besonderheiten der Substituenten werden später genauer betrachtet.

Die Stickstoffe der Heteroaromaten unterliegen einem intramolekularen Austausch des Wasserstoffs, sodass die Tautomerie beim Benzimidazol zu einem sehr breiten Signal bei ca. 5,45 ppm führt. Können sich zudem Wasserstoffbrücken zu z.B. Wasserresten im Lösemittel ausbilden, beeinflusst dies das Signal zusätzlich genauso wie die Temperatur während der Messung. Es kann auch zur Auslöschung des Signals kommen. [160]

Für Imidazol und die anderen Benzimidazole liegt das Signal zwischen 10 und 14 ppm. Dieses Protonensignal verschwindet während der Alkylierung und wird im Beispiel durch ein Quartett (q) und ein Triplett (t) der beiden Ethylgruppen ausgetauscht, die sich bei ca. 4,69 ppm (q, C₁- und C₃-CH₂) und 1,75 ppm (t, C₁- und C₃-CH₃) befinden. Die Alkylierung führt an C₂-Position zu einer Tieffeldverschiebung von ca. 8 ppm zu 11 ppm und die aromatischen Protonen rücken ebenfalls minimal zu höheren ppm (siehe Abbildung 38).

Je nach NHC-Grundkörper können unsymmetrische Strukturen zu einem anderen Aufspaltungs- und Peakmuster führen, worauf später genauer eingegangen wird.

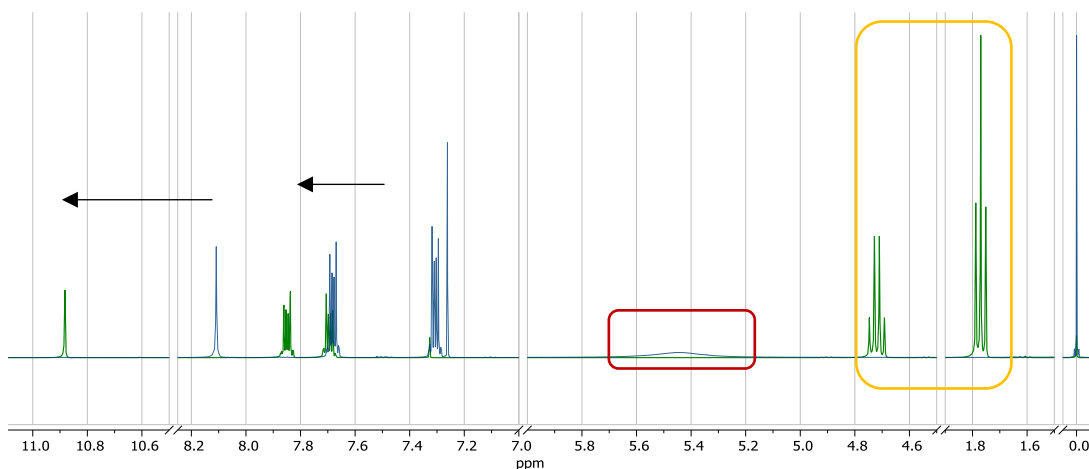


Abbildung 38 Veränderung der Signale im ^1H -Spektrum nach Ethylierung, 1H -Benzimidazol (blaues Spektrum), Substanz 5 (grünes Spektrum); Stickstoffpeak (rote Markierung), Alkylreste (gelbe Markierung), Änderung der chemischen Verschiebung (schwarze Pfeile)

Abbildung 39 zeigt ein ^{13}C -Spektrum sowie das dazugehörige DEPT $_{135}$ -Spektrum von Substanz 5. An den ^{13}C -Spektren erkennt man eine erfolgreiche Reaktion am einfachsten an den zusätzlich erscheinenden Kohlenstoffsignalen der Substituenten oder Liganden.

Der sekundäre Kohlenstoff der Ethylgruppe (CH_2) erscheint um 43,0 ppm und der primäre (CH_3) um 15,0 ppm. Im DEPT $_{153}$ (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) Spektrum ist die Phasenumkehrung des sekundären Ethylkohlenstoffs ein weiterer Hinweis auf eine erfolgreiche Ethylierung.

Die quartären Kohlenstoffkerne an Position C3a und C7a verschwinden in diesem Spektrum, was für alle Komplexe mit quartären Kohlenstoffen als Identifikationsmerkmal genutzt werden kann. Die restlichen aromatischen Kohlenstoffe sind, abhängig von den Substituenten, zwischen 90 und 160 ppm zu finden.

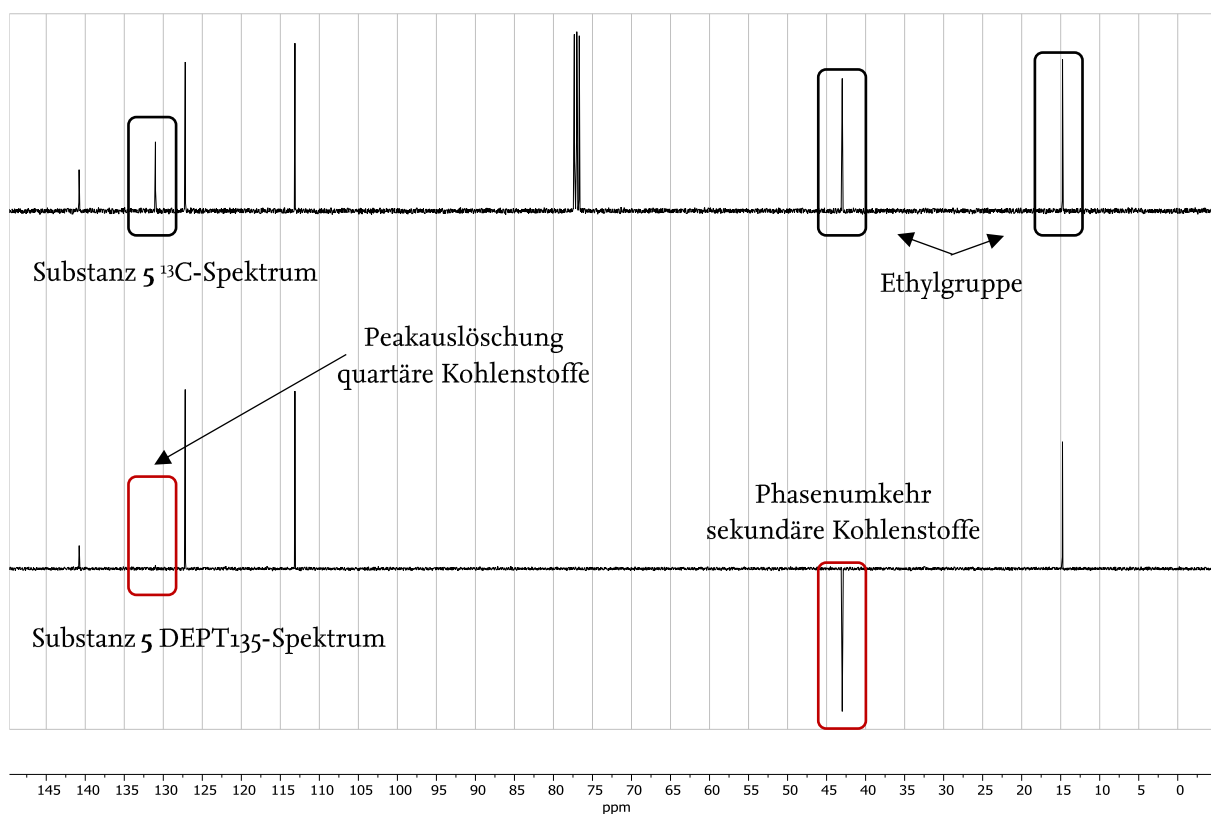


Abbildung 39 ^{13}C -Spektrum (oben) und DEPT $_{135}$ -Spektrum (unten) von Substanz 5

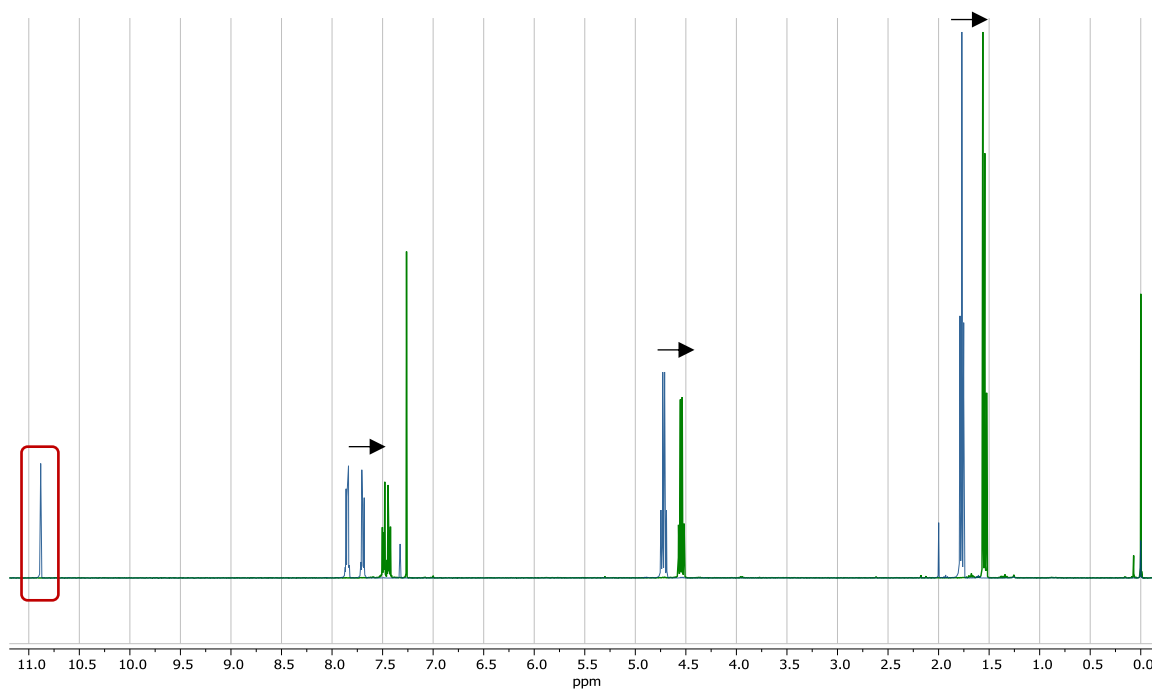


Abbildung 40 Veränderung der Signale im ^1H -Spektrum nach der Transmetallierung, Substanz 5 (blaues Spektrum) und Komplex 14 (grünes Spektrum); Komplex 14 verliert Protonensignal an C2 (rote Markierung), chemische Verschiebung (schwarze Pfeile)

Während der Metallierung und Transmetallierung wird der C₂-Kohlenstoff deprotoniert und der Wasserstoff indirekt durch Gold(I) ausgetauscht. Dies führt zu einem zum Verschwinden des Protonsignals bei ca. 10,88 ppm. Zum anderen sehen wir durch die Metalleinführung eine Hochfeldverschiebung um ca. 0,25 ppm zu niedrigeren ppm der gesamten NHC-Protonen (siehe Abbildung 40).

Beim Ligandenaustausch (siehe Abbildung 41) verschwindet durch die Deprotonierung das Alkinsignal bei 3,00 ppm analog zum Carben. Gleichzeitig erscheinen die zusätzlichen Aromatenprotonen in den Bereichen 6,83 ppm und 7,42 ppm und je nach Substituent auch das jeweilige Signal. Bei Komplex **23** entspricht das einem Singulett bei 3,80 ppm für die Methoxygruppe des Aromaten (AA-M-CH₃).

Ein Einfluss auf die chemische Verschiebung der Alkinprotonen ist nicht ersichtlich. Anders als bei den NHCs, deren gesamtes Molekül an den Donoreigenschaften beteiligt ist, scheint die Interaktion von Metall und Protonen des Alkinliganden nicht so stark ausgeprägt zu sein. Die berechneten Daten aus Kapitel 3 deuten ebenfalls auf eine geringe Interaktion zwischen Goldzentralatom und Alkinsubstituenten hin.

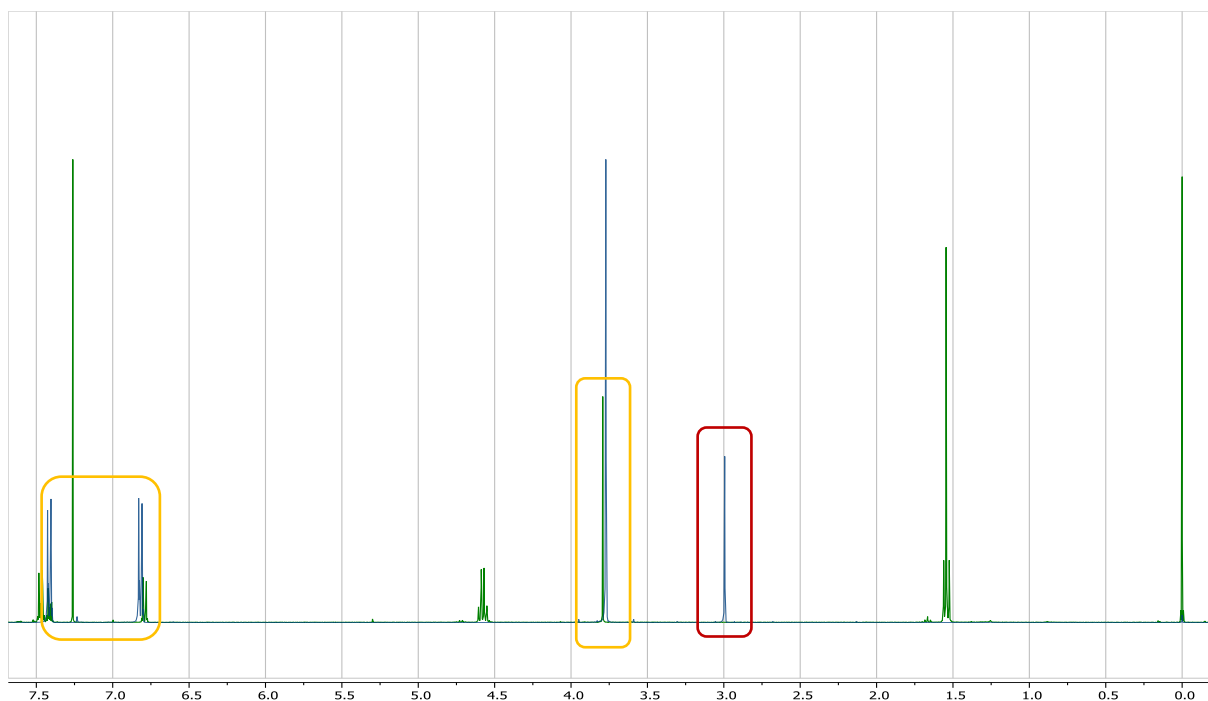


Abbildung 41 Veränderung der Signale im ¹H-Spektrum nach dem Ligandenaustausch, MA (blaues Spektrum) und Komplex **23** (grünes Spektrum); Verschwinden des Alkinprotons (rote Markierung), Erscheinen der MA-signale (gelbe Markierung)

Die Transmetallierung führt an C2 zu einer chemischen Verschiebung hin zu höheren ppm im ^{13}C -Spektrum und der Kohlenstoff verschwindet im DEPT $_{135}$ -Spektrum. Das gleiche Phänomen lässt sich beim Ligandenaustausch von Chlorido- zu Alkinligand für A-C1 und A-C2 beobachten. Die direkt an das Gold grenzenden Kohlenstoffe des Carbens und Alkins werden durch das Gold stark entschirmt und die Kohlenstoffsignale zu höheren ppm verschoben. Dieser Einfluss auf die direkten Koordinationspartner des Metalls ist charakteristisch für das Einführen einer Metallbindung. [161] Abbildung 42 zeigt die ^{13}C -Spektren von Substanz 5, Komplex 14, Komplex 23 und MA im Vergleich. Die markierten Signale zeigen die typische Verschiebung.

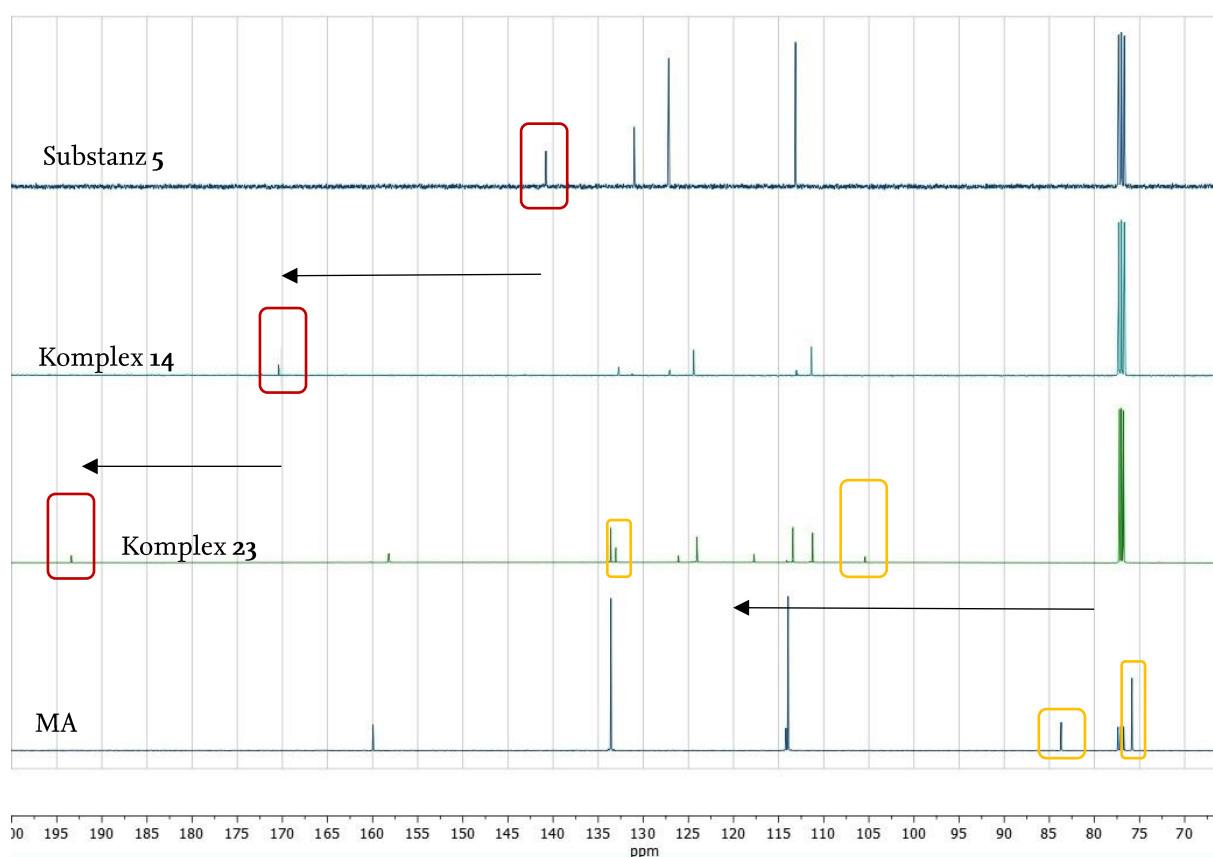


Abbildung 42 ^{13}C -Spektren von Substanz 5, Komplex 14, Komplex 23 und MA, chemische Verschiebung des Carbenkohlenstoffs C2 (rot Markierung), chemische Verschiebung der Alkin Kohlenstoffe A-C1 und A-C2 (gelbe Markierung)

Der Einfluss von Grundkörper und den einzelnen Substituenten ist in den Spektren deutlich zu sehen. Am einfachsten lassen sich die Stickstoffsubstituenten der NHCs vergleichen. Methylierte Komplexe weisen ein Signal zwischen 4,10 bis 4,37 ppm auf, das Aufspaltungsmuster variiert je nach Grundkörper von Singulett zu Duplett (Abbildung 43 Spektren 1 und 3). Die Aufspaltung der Ethylreste führt zu den bereits beschriebenen Triplets und Quartetts (Abbildung 43 Spektrum 2).

Bei Substitution an C₅ sind, wie bereits erwähnt, die beiden Stickstoffreste magnetisch nicht mehr identisch und tauchen manchmal als Triplet von Dupletts (td) (Abbildung 43 Spektrum 4, ca. 1,7 ppm) bzw. als Quartett von Dupletts (qd) oder sogar als Multipllett (m) (Abbildung 43 Spektrum 4, ca. 4,7 ppm) auf.

Des Weiteren führt die Substitution an C₅ der NHCs bzw. an Position AA-C₄ der Alkine zum Verschwinden eines aromatischen Protons und zum Auftauchen neuer Signale wie zum Beispiel eines Singulett der Methoxyprotonen (Abbildung 43 Spektrum 3 und 4, 3,8 - 4,0 ppm).

Zusätzlich ändert sich die chemische Verschiebung der aromatischen Protonen an Position C₄, C₆ und C₇ der NHCs und an Position AA-C₂, -C₃, -C₅ und -C₆ der Alkine, da die Substitution zu einem veränderten elektrischen Umfeld führt (Abbildung 43 aromatischer Bereich).

Wie anfangs erwähnt ist bei den meisten Komplexen eine eindeutige Zuordnung von C₄-, C₆- und C₇-Signal nicht immer möglich, da die Signale mit anderen zusammenfallen und Multipletts ergeben, sodass auch die Kopplungskonstante keine genaue Zuordnung ermöglicht.

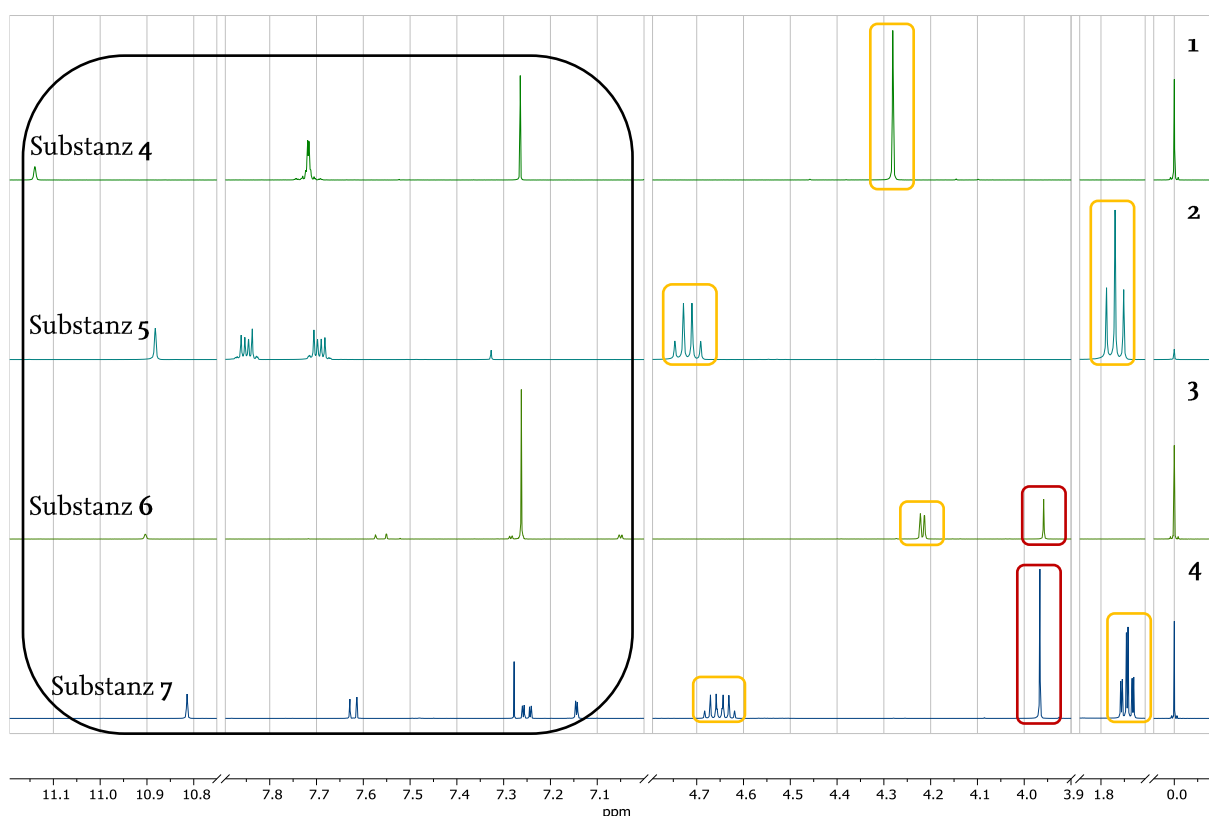


Abbildung 43 ¹H-Spektrum von Substanz 4, 5, 6 und 7 (von oben nach unten); Methyl- und Ethylsignale (gelbe Markierung), Methoxyreste (rote Markierung), aromatischer Bereich (schwarze Markierung)

Die Stickstoffsubstituenten sind bei diesen Komplexen ebenfalls nicht mehr identisch und es erscheinen zwei Signale für C₁ und C₃ (Abbildung 43, Spektrum 3, ca. 4,2 ppm), wohingegen bei Imidazol (Abbildung 43, Spektrum 1, 4,2 - 4,3 ppm) und unsubstituiertem Benzimidazol (Abbildung 43, Spektrum 2, ca. 1,5 und 4,7 ppm) nur ein Signal sichtbar ist.

Eine Besonderheit bei den Ethylgruppen der NHC-Au(I)-Cl und -Alkine stellen Wasserreste dar. In CDCl₃ erscheint das Wassersignal bei 1,56 ppm und die Triplets (C₁- und C₃-CH₃) der Ethylgruppen zwischen 1,47 und 1,59 ppm. Die chemische Verschiebung überlappt sich minimal, die Signale sind meistens aber gut voneinander zu unterscheiden. In manchen Spektren rutscht das Wassersignal jedoch direkt in das Triplet, was an der starken Temperaturabhängigkeit des Wassers im Vergleich zu den untersuchten Substanzen liegt. [160] Eine korrekte Integration ist in diesen Fällen nicht möglich, was die Einschätzung der Reinheit der betroffenen Substanz erschwert. Der Wechsel zu einem anderen Lösemittel wie z.B. DMSO ist wegen der möglichen Koordination von Gold und DMSO kritisch. Das Wassersignal des vollständig deuteriertem DCM (CD₂Cl₂) liegt ebenfalls im Triplettbereich bei 1,52 ppm, sodass dieses Lösemittel auch keine Alternative darstellt. Ist man mangels Alternativen auf die Messung mit CDCl₃ angewiesen, gibt es Möglichkeiten während der Messung Parameter wie Relaxationszeit oder die Temperatur selbst anzupassen. Die meisten Kernresonanzspektrometer sind in der Lage, Lösemittelsignale zu unterdrücken, wovon allerdings auch erwünschte Signale betroffen sein können.

Während der Substanzcharakterisierung taucht dieses Phänomen trotz Gerätetemperierung vor allem an heißen Tagen auf. Durch Wiederholung der Messung an kühleren Temperaturen lässt sich das Problem meist lösen. Für Substanzen wie Komplex **19**, dessen Signale durch seine Substituenten sehr nah am Wassersignal liegen, ist das Phänomen sogar von Vorteil, wenn die Verschiebung groß genug ist und das Wassersignal dadurch aus dem Triplet rutscht. Abbildung 44 zeigt die Wanderung des Wasserpeaks in Spektren von Komplex **19** und **23**.



Abbildung 44 Wassersignal (gelbe Markierung) und CH_3 -Triplett der Ethylgruppe von Komplex **23** (oben, verrutschtes Wassersignal bei höheren ppm), **19** (Mitte, Wassersignal stört im Triplett) und **23** (unten, verrutschtes Wassersignal bei niedrigeren ppm)

Das methylierte Benzimidazol zeigt ebenfalls einen interessanten Peak. Durch seine symmetrische Struktur und den geringen Einfluss durch Substituenten zeigen sich die Protonen des NHC-Aromaten in manchen Spektren nicht als Multiplett sondern als Singulett mit einem vier Protonen entsprechenden Integral.

Die anderen NHC-Grundkörper mit den verschiedenen Resten an C_5 zeigen, wie bereits erwähnt, unterschiedliche Aufspaltungsmuster an den Stickstoffresten, aber auch an den aromatischen Protonen. Gleichzeitig ändert sich auch deren chemische Verschiebung. Die aromatischen NHC-Protonen an C_4 , C_6 und C_7 koppeln untereinander und geben oft einzelne Signale, die je nach Auflösung des Spektrums als d, dd, ddd oder m erscheinen. In manchen Spektren fallen C_4 und C_6 zusammen und ergeben ein Multiplett. Die chemische Verschiebung wird vom Elektronenumfeld der Atome beeinflusst. Für die NHC-Grundkörper ergibt sich eine Regelmäßigkeit für die ppm-Werte der aromatischen Protonen, die in Abbildung 45 zusammengefasst ist.

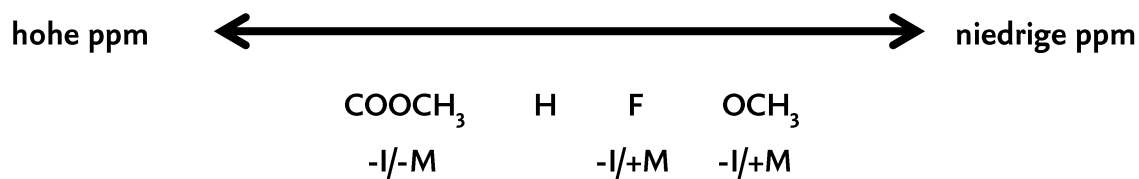


Abbildung 45 Einfluss auf die chemische Verschiebung je nach NHC-Substitution

Am Alkin sehen wir je nach Aromatenrest jeweils chemische Verschiebungen, die sich analog zu den NHC-Aromaten verhalten. Durch die Symmetrie des Aromaten erscheinen die Signale für AA-C₂ und AA-C₆ bzw. AA-C₃ und AA-C₅ zusammen. Eine Ausnahme bildet dabei MA, das in manchen Spektren zu einer weiteren Aufspaltung der zwei Aromatensignale führt. Dies liegt an der freien Drehbarkeit der AA-C₄-M-CH₃-Gruppe. Je nach räumlicher Orientierung kann dieser Rest dazu führen, dass die aromatischen Protonen magnetisch nicht mehr identisch sind.

Abbildung 46 zeigt die Spektren von Komplex **32** (HB-Au-HA, Spektrum 1), **25** (MB-Au-MA, Spektrum 2) und **31** (FB-Au-FA, Spektrum 3).

Die unterschiedlichen Aufspaltungsmuster für q und t der Ethylreste sind deutlich zu erkennen (Abbildung 46, gelbe Markierung).

Das Erscheinen von zwei Singulets (Abbildung 46, Spektrum 2, rote Markierung) im Bereich 3,7 bis 3,9 ppm zeigt eine Substitution mit Methoxygruppen an den Aromaten.

Zwischen 6,7 und 7,6 ppm erscheinen die aromatischen Protonen beider Goldliganden. Je nach Substituent ändert sich die chemische Verschiebung sowie das Aufspaltungsmuster, sodass sich oft Protonen überlagern und nicht immer eindeutig zugeordnet werden können, sondern in Multipletts zusammenfallen (Abbildung 46, aromatischer Bereich, schwarze Markierung).

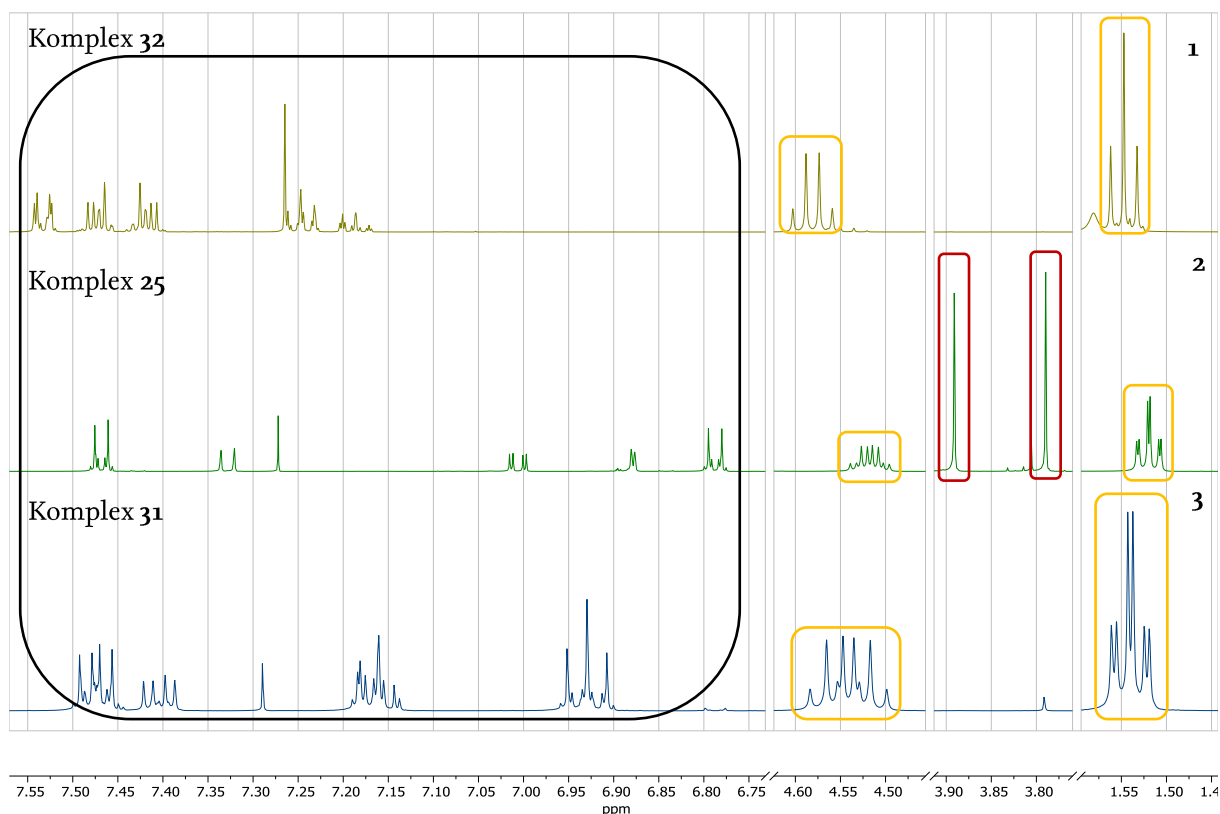


Abbildung 46 ^1H -Spektren von Komplex **32**, **25** und **31** (von oben nach unten), Aufspaltungsmuster der Ethylgruppen (gelbe Markierung), Signale der Aromatensubstituenten (rote Markierung), aromatischer Bereich (schwarze Markierung)

Die Komplexe mit Fluorsubstituent fallen hier besonders auf, da Fluor durch den gemeinsamen Spin von $\frac{1}{2}$ mit Wasserstoff und Kohlenstoff koppeln kann. Zusätzlich zu der erwähnten Verschiebung kann es ebenfalls zu einer besonderen Aufspaltung kommen. In ^1H -Spektren tauchen dadurch dd mit sehr großen Kopplungskonstanten auf. Da die beteiligten Protonen jedoch ein rein aromatisches Umfeld aufweisen, sind oft nur Multipletts zu erkennen. Die Kohlenstoffkerne in Fluornachbarschaft zeigen entsprechend Dupletts in den ^{13}C -Spektren.

Während der Synthese lässt sich eine erfolgreiche Reaktion zusätzlich über die leicht wandernden Fluorsignale nachvollziehen. Substanz **1** zeigt ein Fluorsignal bei ca. - 120 ppm (Abbildung 47, grünes Signal), dieses wandert nach der Ethylierung (Substanz **10**) zu ca. - 110 ppm. An dieser Stelle befindet sich auch das freie Alkin (FA) (Abbildung 47, blaues Signal). Nach der Transmetallierung (Komplex **19**) erscheint das Fluorsignal des NHCs bei ca. - 116 bis 117 ppm und der Ligandenaustausch (Komplex **28**) führt dazu, dass das Fluorsignal des Alkins zu ca. - 114 ppm wandert (Abbildung 47, türkises Signale).

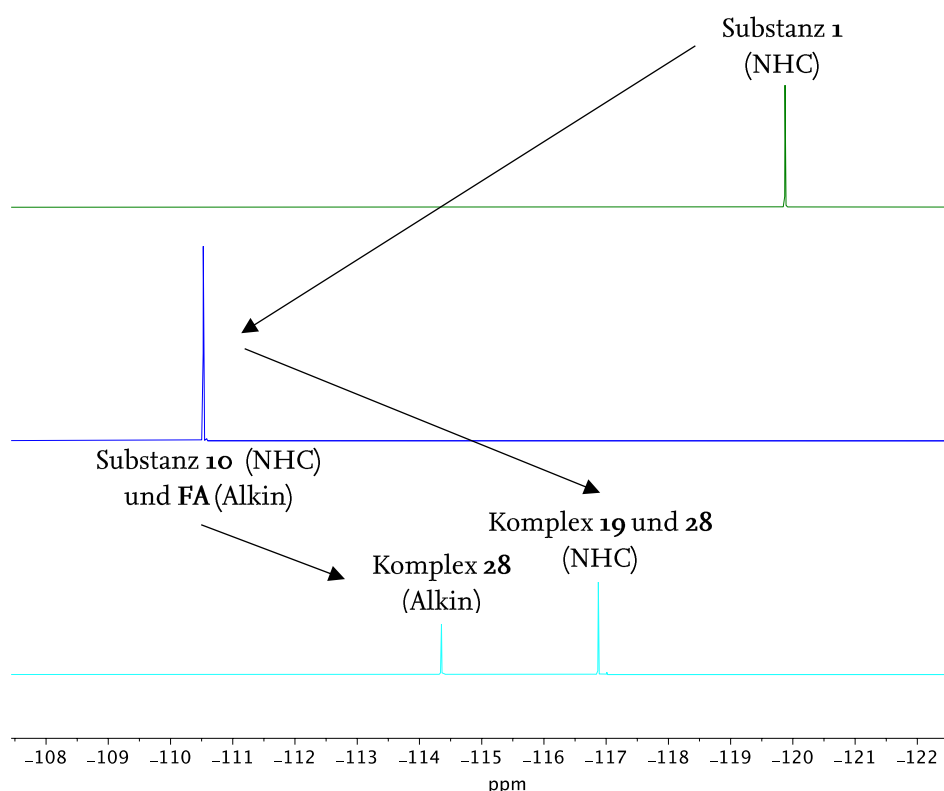


Abbildung 47 ^{19}F -Spektren von Substanz 1 (grün) Substanz 10 und FA (blau, liegen übereinander) und Komplex 19 und 28 (türkis, liegen übereinander), fortschreitende Syntheseschritte (schwarze Pfeile)

Bei der Charakterisierung von neuen Komplexen ist die Untersuchung mittels Massenspektrometrie ebenfalls eine oft genutzte Methode. Die dabei gewonnenen Daten zeigen Molekülionen bzw. Fragmente der Testsubstanz, die nach deren Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z) eingeteilt sind. Die Fragmente entstehen in einer chemischen Zerfallsreaktion, hervorgerufen durch einen Ionisationsprozess, der auf unterschiedliche Art initiiert werden kann. Für die Komplexe werden zur Ionisierung Elektronenstoß- (EI) und Elektronensprayionisation (ESI) verwendet.

Der Molekülpeak $[M]$ ist ein Beweis dafür, dass eine Verbindung mit der Masse der Zielstruktur detektiert werden konnte. Eine Vorhersage der Fragmentierung ist äußerst schwierig. Da je nach Ionisationsart und -energie andere Zerfallsprodukte entstehen, sind die Ergebnisse verschiedener Messungen auch nicht leicht vergleichbar. Bestimmte Fragmente sind logische Zerfallsprodukte und können als Hinweis für eine Zielstruktur dienen oder sogar auf die Stabilität von Liganden hindeuten. In manchen Fällen kommt es auch zu Addition von Wasser oder Fragmenten von Zerfallsprodukten. Hierbei werden im Detektor Massen gemessen, die größer als der Molekülpeak sind.

Für die NHC-Au(I)-Alkine lassen sich gewisse Regelmäßigkeiten erkennen, die die Analyse vereinfachen. Mit fortschreitender Synthese können die größer werdenden Substanzen gut detektiert werden. Ein Molekülpeak ist immer zu finden. Da unterschiedliche Ionisationsmethoden verwendet werden und die Fragmentierung von sehr vielen Faktoren abhängig ist, kann nicht immer jedes logisch erscheinende Fragment gefunden werden. Einige Fragmente tauchen jedoch wiederholt auf.

Für die alkylierten Vorstufen wird die Masse ohne das Iodidgegenion ($[M-I]^+$) detektiert. Des Weiteren sind Fragmente mit nur einem alkylierten Stickstoff ($[M-CH_3]^+$ oder $[M-C_2H_5]^+$) zu finden. Besitzt eine Substanz eine Methoxygruppe, lässt sich oft die Abspaltung der CH_3 -Gruppe erkennen, was zu einer Masse von -15 m/z ($[M-CH_3]^+$) bzw. -30 m/z ($[M-C_2H_6]^+$) führt, wenn zwei Methoxygruppen vorhanden sind. Die methylierten Vorstufen zeigen zudem manchmal eine um $+14\text{ m/z}$ größere Masse. Dies könnte eine Reaktion von C_2 mit einer freien CH_3 -Gruppe und Abspaltung von H^+ sein, sodass am Ende $[M+CH_2]^+$ entsteht.

Für die Transmetallierungsprodukte lassen sich zusätzlich Ionen ohne Chloridoligand finden $[M-Cl]^+$ ($-34,97\text{ m/z}$), genauso wie NHC-Ionen ohne Metall $[M-Au-Cl]^+$ ($-231,9\text{ m/z}$). Manchmal taucht eine um $91,93\text{ m/z}$ größere Masse auf. Dies scheint ein Austausch von Chlorido- zu Iodidoligand zu sein $[M-Cl+I]^+$. Das Iodid kann in kleinen Mengen als Verunreinigung in der Substanz selbst oder im Gerät vorliegen.

Nach dem Ligandenaustausch lassen sich neben dem Molekülpeak und den beschriebenen Abspaltungen zwei Hauptfragmente erkennen: $[M-Alkin]^+$ sowie $[M-NHC]^+$. Das bedeutet, dass beide Goldbindungen während der Ionisation zerfallen können. Im Verhältnis lässt sich das NHC-Gold-Fragment deutlich öfter finden als das Alkin-Gold-Fragment, was auf eine stabilere Bindung von NHC und Gold hindeutet. Die BDE aus Kapitel 3.3 lassen jedoch darauf schließen, dass das Alkin stabiler an das Gold bindet, was an dieser Stelle nicht bestätigt werden kann.

In einigen Messungen erscheint eine um $22,1$ größere Masse, die ein Natriumsalz darstellt $[M+Na]^+$.

Die Alkine bilden zudem oft Dimere, sodass regelmäßig die fixen Massen $202,1\text{ m/z}$ (HA-Dimer), $238,1\text{ m/z}$ (FA-Dimer) und $262,1\text{ m/z}$ (MA-Dimer) auftauchen.

Der Molekülpeak und einige der wiederkehrenden Fragmente beweisen eine erfolgreiche Synthese der NHC-Au(I)-Alkine.

Die gemessenen Daten aus NMR-, CHN- und Massenanalytik zur Charakterisierung der Vorstufen und Komplexe sind in Kapitel 8.5 zusammengestellt. Die NMR-Auswertung erfolgte mit dem Programm Mnova (Mestrelab Research, Santiago de Compostela).

4.4 Phosphan-Au(I)-Alkin-Synthese-Optimierung

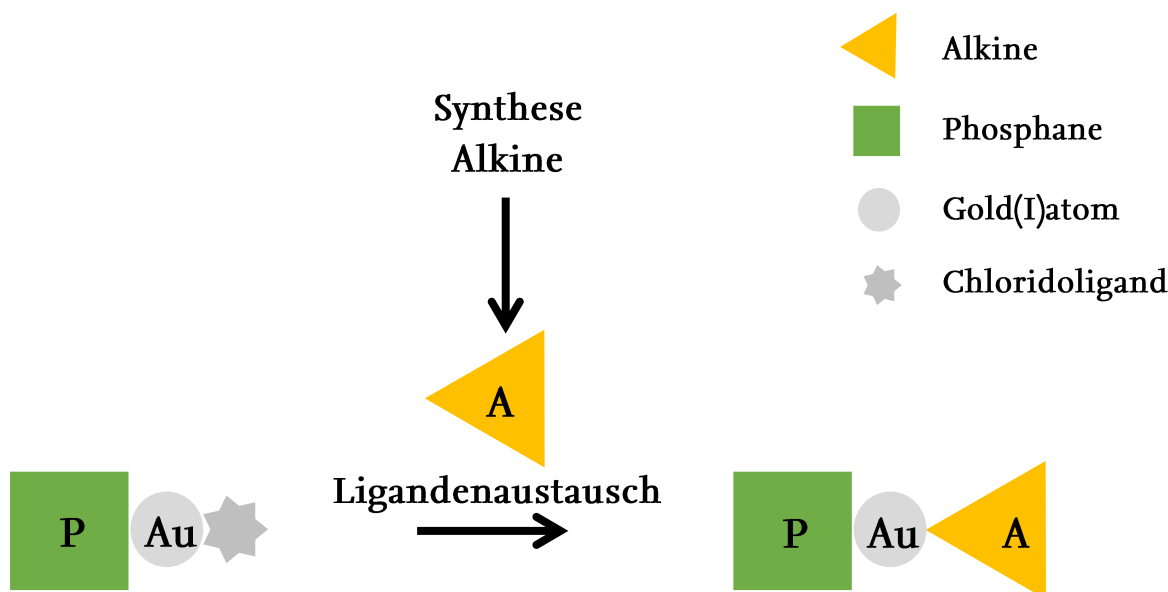


Abbildung 48 Syntheseübersicht für Phosphan-Au(I)-Alkine

Dieses Kapitel befasst sich mit der Syntheseoptimierung der Phosphan-Au(I)-Alkine und gehört somit zum zweiten Themenbereich der vorliegenden Arbeit. Die verwendeten Methoden werden verglichen und in Hinblick auf ihren Nutzen bewertet.

Die meisten Phosphan-Au(I)-Alkine können in einer Eintropfreaktion durch Ligandenaustausch gewonnen werden (Abbildung 48). Eine Vielzahl von Phosphan-Au(I)-Cl sowie Alkinen kann käuflich erworben werden, sodass nur bei speziellen Substanzen eine vorausgehende Alkylsynthese erfolgen muss. Die Bedingungen für den Ligandenaustausch von Phosphan-Au(I)-Cl zu Phosphan-Au(I)-Alkylen sind im Arbeitskreis für einige schwer lösliche Phosphan-Au(I)-Alkine gut etabliert, erreichen jedoch bei kleineren Phosphanen wie dem

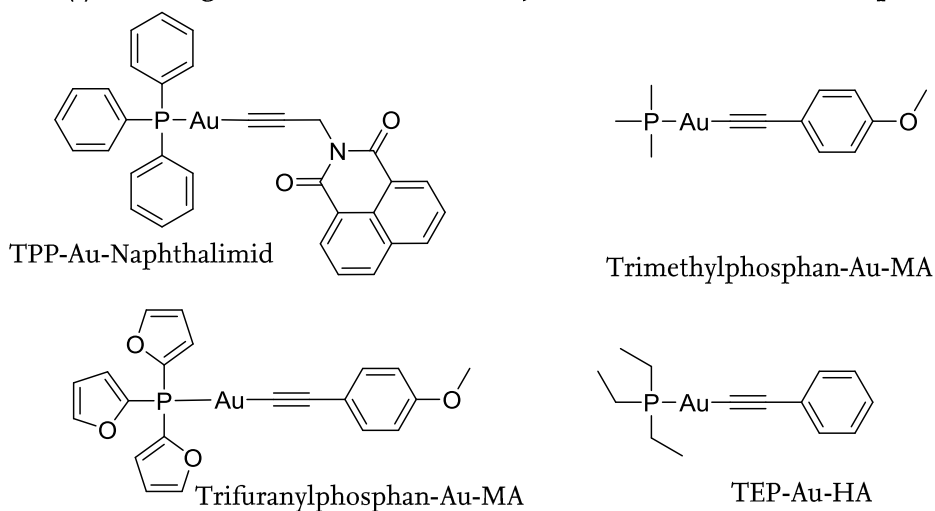


Abbildung 49 Vergleich der Phosphan-Au(I)-Alkine in Bezug auf Größe und Löslichkeit der Liganden

Triethylphosphan keine befriedigenden Ausbeuten. Die stark variierende Lipophilie und Größe der Liganden haben dabei großen Einfluss auf die Aufreinigung und Gewinnung der Komplexe. In Abbildung 49 sind vier der hergestellten Phosphan-Au(I)-Alkine als Beispiele für die große Vielfalt der Strukturen zu sehen. Triphenyl- und Tri-(2-furyl)-Phosphan sind im Vergleich zu Trimethyl- und Triethylphosphan deutlich größer und lipophiler, was zu einer sehr geringen Löslichkeit in Wasser führt und eine Fällung vereinfacht. Der Naphthalimidrest ist ebenfalls unlöslich in polaren Lösemitteln und der Größenunterschied zu Phenyl oder Methoxyphenyl ist deutlich.

Aus diesen Gründen erfolgt eine Überarbeitung der Synthese basierend auf der für die NHC-Au(I)-Alkine entwickelten Methode. Gleichzeitig soll der Einfluss der Alkinliganden weiter untersucht werden, wozu neue Komplexe synthetisiert werden. Die Übersicht über die innerhalb dieses Projektes hergestellten Phosphan-Au(I)-Alkine findet sich in Kapitel 2.3. Die praktische Arbeit wurde von Andreas Meyer (Methode 1), Vincent Andermark (Methode 2), Luciano Oehninger (Methode 3), Dr. Svenja Kankowski (Methode 4) und Andre Prause (Methode 5) in Zusammenarbeit mit mir durchgeführt.

Die Ergebnisse der Syntheseoptimierung sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Diese zeigt die verschiedenen Reaktionsbedingungen, Aufreinigungsmethoden und Ausbeuten, die innerhalb der Arbeitsgruppe für alle Phosphan- und Alkinkombinationen genutzt werden. Methoden 1 und 2 funktionieren für sehr große und lipophile Komplexe wie **Ref2** gut, die Ausbeuten und der Zeitaufwand sind akzeptabel. Wird das Triphenylphosphan gegen einen kleineren Liganden ausgetauscht, zeigt sich jedoch, dass die Methoden trotz hohen Zeitaufwands nur Ausbeuten um die 11 % hervorbringen.

Die Übertragung der Aufreinigung über Ausschütteln der NHC-Au(I)-Alkine führt zu einer deutlichen Erhöhung der Ausbeute (Methode 3). Die Herstellung der Phosphan-Au-Alkine nimmt jedoch immer noch viel Zeit in Anspruch und unterliegt je nach durchführender Person sehr starken Schwankungen. Der Versuch, die Reaktionstemperatur zu erhöhen und das Ausfällen zu umgehen, führt analog zur NHC-Au(I)-Alkinsynthese zu konstant hohen Ausbeuten (Methode 4 und 5). Die Verlängerung der Reaktionszeit zeigt ebenfalls einen positiven Einfluss auf die Ausbeute.

Methode		1	2	3	4	5
Lösemittel		Methanol/ Ethanol (1:1)	Methanol/ DCM	Methanol/ DCM	Methanol/ DCM	Methanol/ DCM
Äquivalente	Alkin	1	1	1	1	1,2
	Base	4	1	3	6	6
	Phosphan	1	1	1	1	1
Reaktions- bedingungen	Temperatur	RT	RT	RT	RT - 65 °C/ RT	65 °C/ RT
	Dauer	5 min/ 72 h	10 min/ 2 - 18 h	10 min/ 2 h	10 min/ o - 6 h/ 60 h	10 min/ 6 h/ 60 - 72 h
	Besonderheit		Lichtschutz	Lichtschutz	Lichtschutz (nicht immer nötig)	Lichtschutz
Aufreinigung	Fällung	-	-20 °C	-20 °C	-	-
	Fällungszeit	-	o - 72 h	72 h	-	-
	Zwischen- schritte	Filtrieren/ Waschen mit Methanol	Filtrieren/ Waschen mit H ₂ O oder Methanol	Filtrieren/ Einengen/ DCM	Einengen/ DCM/ Filtrieren	Einengen/ DCM
	Ausschütteln	-	-	DCM 3x mit H ₂ O	DCM 3x mit H ₂ O	DCM 3x mit H ₂ O
	Zwischen- schritte	-	-	Trocknen mit Na ₂ SO ₄	Trocknen mit Na ₂ SO ₄	Trocknen mit MgSO ₄
	Feststoff- gewinnung	Trocknen	Trocknen	Einengen	Einengen	Einengen
Ausbeute		32 - 57 %	11 - 79 %	14 - 58 %	45 - 63 %	69 - 97 %

Tabelle 11 Übersicht über die Reaktionsbedingungen verschiedener Arbeiten mit kleinen Phosphan-Au(I)-Alkinen

Zusammenfassend kann man sagen, dass ein Basenüberschuss von ca. 6 Äquivalenten das Alkin ausreichend deprotoniert. Nutzt man einen kleinen Überschuss Alkin (1,2 Äquivalente), erhöht das die Ausbeute konstant und der Überschuss wird während des sehr effektiven Ausschüttelns entfernt. Je nach genutztem Alkin kann die Reaktion mit oder ohne Wärmezufuhr durchgeführt und die Reaktionszeit kann über DC kontrolliert werden. Die Reaktion muss nicht immer unter Lichtschutz stattfinden, aber manche Liganden scheinen lichtempfindlich zu sein.

Folgende Schlussfolgerungen können für die Phosphan-Au(I)-Alkin-Synthese gezogen werden:

- die meisten Komplexe unterliegen keiner Zersetzung bei hohen Temperaturen
- Reaktionszeit und Temperatur sollte an die Liganden angepasst werden
- deutlicher Basenüberschuss begünstigt die Reaktion
- kleiner Alkinüberschuss begünstigt die Reaktion
- Ausschütteln führt zu deutlich höheren Ausbeuten als Fällung

Die Phosphan-Au(I)-Alkine und die NHC-Au(I)-Alkine verhalten sich während der Synthese ähnlich, sodass für beide Substanzklassen Methoden und Bedingungen übertragbar sind. Für weitere Reaktionen können diese Bedingungen genutzt werden und liefern eine sehr gute und effektive Synthese- und Aufreinigungsmethode für Folgeprojekte.

5 Untersuchungen des Potentials als Zytostatika

Wie in Kapitel 1.3, 2.1 und 2.2 beschrieben, sollen die neuen Komplexe als mögliche Chemotherapeutika untersucht werden. Nach einer erfolgreichen Synthese und Aufreinigung der neuen NHC-Au(I)-Alkin-Komplexe kann ein Screening durchgeführt werden, bei dem verschiedene biologische Effekte untersucht werden, die das Potential der Komplexklassen wiedergeben. Das folgende Kapitel befasst sich im Einzelnen mit den verschiedenen durchgeführten Versuchen. Die Einschätzung des Potentials der neuen Komplexklasse befindet sich in Kapitel 7.1.

Zu den möglichen Untersuchungen gehört der Test auf das antiproliferative (=zytostatische) Verhalten und die Frage, ob die Komplexe sogar zytotoxische Effekte aufweisen. Zeigen die untersuchten Zellen eine morphologische Veränderung oder haben die Substanzen anderen Einfluss auf die Zellen als nur eine Wachstumshemmung? Zeigt sich eine Selektivität gegenüber einer Zellart? Sind die Substanzen ausreichend löslich für alle Versuche? Wie werden die Substanzen in die Zellen aufgenommen? Akkumulieren sie in den Zellen oder werden sie wieder ausgeschleust? Gibt es Zielstrukturen, die identifiziert werden können? Können anhand der chemischen Eigenschaften und biologischen Untersuchungen Strukturwirkungsbeziehungen aufgestellt werden? Können neue Methoden erschlossen werden, um die biologischen Eigenschaften der Komplexe gezielt zu untersuchen und das vorhandene Versuchsrepertoire zu erweitern?

Für viele dieser Fragestellungen ist eine eigene Zellkultur vorteilhaft. Da mit NHC-Au(I)-Alkinen bisher keine biologischen Untersuchungen durchgeführt wurden, sollen die Komplexe nicht nur einem ersten Screening unterzogen, sondern auch verschiedene Testverfahren mit einzelnen Vertretern der Komplexe durchgeführt werden, um zu ermitteln, welche Methoden sinnvoll und durchführbar sind.

5.1 Antiproliferationsuntersuchungen

Zytostatika sollen das Wachstum und die Teilung von Tumorzellen möglichst selektiv reduzieren bzw. komplett stoppen. Im Idealfall führt eine Behandlung mit einem Zytostatikum zur Apoptose von Tumorzellen ohne dabei gesundes Gewebe zu beeinflussen.

In der Zellkultur erkennt man gesunde bzw. vitale Zellen an ihrem funktionierenden Stoffwechsel. Hierbei wird nur die Gesundheit der Kultur betrachtet und nicht bewertet, was für eine Art von Zellen kultiviert werden. Krebszellen sind per Definition nicht gesund, aber als Zelllinie sollen sie trotzdem einheitlich und ihren Eigenschaften entsprechend wachsen. Man erkennt also eine gesunde Zellkultur an der Aktivität verschiedener Enzyme, sowie an ihrem spezifischen Proliferationsverhalten, also an dem Wachstum und der Zellteilung. Innerhalb einer Zellkultur können deshalb enzymatische Prozesse und die Zellmasse herangezogen werden, um die Zellpopulation auf Vitalität und Viabilität zu untersuchen.

Ein Maß für die Aktivität eines Wirkstoffs ist die Konzentration, bei der die Zellviabilität im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf die Hälfte reduziert wird. Diese Konzentration wird IC_{50} -Wert (*inhibitory concentration*) genannt und kann, wie in Abbildung 50 gezeigt, anhand der Korrelation von Konzentration und korrigiertem Wachstumsanteil ermittelt werden.

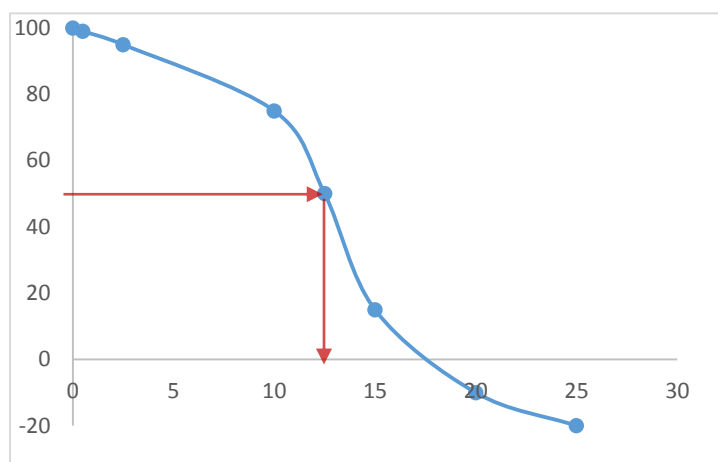


Abbildung 50 Beispiel einer Wachstumsinhibitionskurve mit dem korrig. Wachstumsanteil [%] als y-Achse und der Substanzkonzentration [µM] auf der x-Achse, die roten Pfeile zeigen das 50%-Wachstum und die dazugehörige Konzentration (=IC₅₀)

Je kleiner der IC_{50} -Wert ist, desto aktiver ist somit die Substanz. Eine kleinere Konzentration wird benötigt, um die Proliferation um die Hälfte zu reduzieren. Mit Substanzen, die keine Wirkung zeigen, können die Testzellen somit innerhalb der gesamten Verdünnungsreihe 100 % Wachstum oder mehr erreichen. Antiproliferativ oder zytostatisch wirkende Substanzen zeigen einen Anteil von 0 bis 100 % und zytotoxische Substanzen bzw. Konzentrationen liefern Ergebnisse unter 0 %. Sie unterdrücken somit nicht nur das Wachstum und die Teilung der Zellen, sondern leiten ihren Tod ein, sodass die Zellmasse und -anzahl abnimmt. Für die Metallkomplexe werden IC_{50} -Werte über 100 µM als irrelevant eingestuft, da ihre Aktivität zu

gering ist. Krebszellen sind durch einen hohen Stoffwechsel und eine unkontrollierte Teilung ohne Apoptose charakterisiert, sodass die Wachstums- und Teilungshemmung eine der wichtigsten Eigenschaften für Zytostatika darstellt.

Im Arbeitskreis wird der IC_{50} -Wert photometrisch mittels Kristallviolett-Färbung ermittelt. Nach der Inkubation mit den Testsubstanzen werden die Zellen von Medium und abgestorbenen Zellen befreit, mit Glutaraldehyd am Plattenboden fixiert und das Chromatin der Zellen mit dem Triphenylmethanfarbstoff angefärbt (siehe Kapitel 8.6.8). Die Konfluenz der Zellen sollte maximal bei 75 % liegen, da darüber die Linearität zwischen Zellanzahl und Absorption nicht mehr gewährleistet ist. [162–164] Im Arbeitskreis hat sich diese Methode etabliert. Die Messungen können auch mit anderen Farbstoffen wie z.B. Coomassie *brilliant blue* G, MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromid) oder Neutralrot durchgeführt werden. [165–168] Die Farbstoffe interagieren mit verschiedenen Zellorganellen oder werden durch Enzyme umgesetzt, wodurch eine messbare Färbung entsteht, die von der Zellmenge abhängig ist.

In Abbildung 51 ist die Belegung einer mit Kristallviolett angefärbten 96-Lochplatte zu sehen, wobei pro Platte zwei Substanzen getestet werden können (Reihen A-D und E-H). Die Lösemittelkontrolle (100 %) befindet sich in den Löchern A 1-6 und E 1-6 und die verschiedenen Konzentrationen werden aufsteigend in jeweils sechs Löcher pipettiert. Da die Arbeit mit lebenden Zellen trotz Beachtung von Faktoren wie Konfluenz oder maximaler Absorption sehr starken Schwankungen unterliegt, soll der Mittelwert der Sechsfachbestimmungen diese Fehler reduzieren.

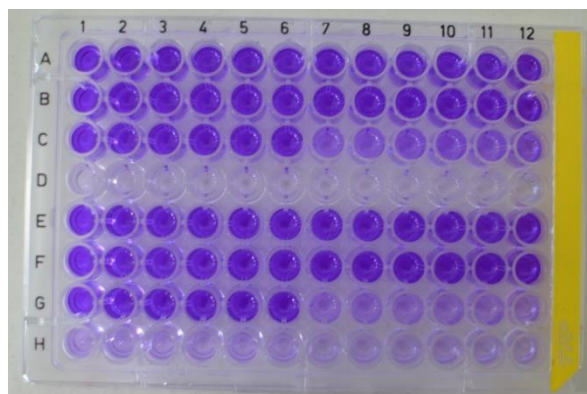


Abbildung 51 Belegung einer 96-Well-Platte, angefärbt mit Kristallviolett

Für die Ergebnisberechnung wird von den Testplatten jeweils die Absorption der Zellen zum Zeitpunkt des Versuchsstarts abgezogen (t_0 -Wert, eigene Platte). Die Lösemittelkontrolle entspricht dem ungestörten Wachstum der Zellen und wird somit als 100 % definiert. Die getesteten Konzentrationen reduzieren das Wachstum im Vergleich zur Lösemittelkontrolle in Prozent, wobei die Konzentration, bei der die Biomasse 50 % der Kontrolle erreicht, dem bereits erwähnten IC_{50} -Wert entspricht. In den ersten Versuchen wird eine breite Verdünnungsreihe angelegt, die dann während der Wiederholungen angepasst wird, um den Bereich des IC_{50} -Wertes so genau wie möglich zu ermitteln.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der neu synthetisierten Komplexe auf die vier genutzten Zelllinien (siehe Kapitel 8.4) dargestellt. HT-29, MCF-7 und MDA-MB-231 sind Tumorzellen. RC-124 dient als Kontrolle für gesunde Zellen, wobei bedacht werden muss, dass auch diese Zelllinie für eine funktionierende Zellkultur immortalisiert wurde. Da nicht alle Komplexe in ausreichender Menge oder Reinheit hergestellt werden konnten, liegen nicht für alle Substanzen biologische Daten vor.

Während der praktischen Arbeit werden zwei verschiedene Chargen von Zellen verwendet, worauf später genauer eingegangen wird. Zur besseren Unterscheidung werden alle Ergebnisse mit der sogenannten alten Charge in den Tabellen grau hinterlegt und die Ergebnisse mit der neuen Charge weiß.

Die Vorstufen der Gold-Komplexe zeigen bis zu Konzentrationen von 100 μ M keine bis minimale Effekte auf die Zellen. Zu den Vorstufen zählen Imidazol, die verschieden substituierten Benzimidazole (inkl. Substanz **1**), die daraus resultierenden methylierten bzw. ethylierten Liganden (**2** - **10**) sowie die Alkinliganden (HA, MA, FA und Mestranol). Dies ist positiv zu bewerten, da die Substanzen ohne Metall keine eigene Aktivität aufweisen und somit mögliche Effekte auf dem Gold(I)-Komplex basieren. Dr. Claudia Schmidt konnte zudem zeigen, dass $Au(I)Cl$ bis zu Konzentrationen von 300 μ M keinen Einfluss auf die untersuchten Zelllinien zeigt, da die Zellaufnahme für das Salz extrem gering ist. Für eine zytotoxische Wirkung sind also die gesamten Komplexe nötig, da die Liganden essentiell für eine Aufnahme sind und Gold(I) als aktives Agens stabilisieren. [169]

Eine Ausnahme lässt sich unter den Nierenzellen finden, da bereits einige Liganden das Wachstum der gesunden Zelllinie hemmen (siehe Tabelle 12). Liganden 4, 6 und 8 sind die verschiedenen methylierten Benzimidazole und hemmen in hohen Konzentrationen das Wachstum der Nierenzellen. Wie bereits erwähnt, sind die Nierenzellen besonders zu betrachten, da sie zum einen immortalisiert wurden und zum anderen eine Gelatinebeschichtung und spezielles Medium zum Wachstum brauchen. Sie sind somit insgesamt anfälliger für Veränderung und Stress. Warum nur die methylierten Benzimidazole einen Einfluss haben, kann nicht ausreichend geklärt werden. Es könnte möglich sein, dass die Liganden durch ihre schmale Form mit zellspezifischen Enzymen, Transportern oder anderen Strukturen interagieren und so das Wachstum stören. Eine abschließende Erklärung kann jedoch für die geringe Aktivität nicht gefunden werden.

Substanz	IC ₅₀ -Wert [μ M]
2	> 100
3	> 100
4	64,9 ^{±14,1}
5	> 100
6	41,0 ^{±4,6}
7	> 100
8	68,3 ^{±14,1}
9	> 100
10	> 100
HA	> 100
FA	> 100
MA	> 100

Tabelle 12 IC₅₀-Werte der verschiedenen Liganden für die Nierenzellen RC-124

Das Ethinylestradiolprodrug Mestranol wird ebenfalls untersucht und zeigt interessante Ergebnisse. Erwartet wurde ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Brustkrebszelllinien MCF-7 und MDA-MB-231, da sie unterschiedlich empfindlich auf Hormone reagieren. Eine Selektivität gegenüber einer Zellart könnte zusätzlich auf mögliche Targets hindeuten. Tabelle 13 zeigt die IC₅₀-Werte für den Mestranolliganden an allen vier Zelllinien.

Substanz	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231	RC-124
Mestranol	9,0 ^{±2,0}	49,4 ^{±13,2}	24,8 ^{±3,1}	> 100

Tabelle 13 IC₅₀-Werte [μ M] für Mestranol auf den vier untersuchten Zelllinien

Die Nierenzellen werden von Mestranol nicht beeinflusst, was eine Selektivität gegenüber den tumorösen Zellen andeutet. Ethinylestradiol wird im Körper hauptsächlich über den Darm ausgeschieden und nur ein kleiner Teil über die Niere [120], dies ist für die Metabolisierung und Ausscheidung zwar interessant, jedoch keine Begründung für die Selektivität.

Die estrogenabhängigen MCF-7-Zellen zeigen den höchsten IC₅₀-Wert, gefolgt von der hormonunabhängigen Zelllinie MDA-MB-231. HT-29 unterliegt der stärksten Wachstumshemmung. MCF-7 scheinen auf die Inkubation mit Mestranol am geringsten zu reagieren. Die Zellen könnten durch ihre Reaktivität gegenüber Estrogenen auch Mechanismen besitzen, die eine Verarbeitung bzw. den Abbau des Mestranols induzieren. Dann wäre eine größere Dosis nötig, um das Wachstum der Zellen negativ zu beeinflussen. Körpereigene Hormone werden im Verlauf ihres Metabolismus im Körper sulfatiert und hydroxyliert, sodass sie den Darm erst im metabolisierten Zustand passieren. Die Kolonzellen weisen somit für den Kontakt mit unmetabolisiertem Mestranol wahrscheinlich keine Schutzmechanismen auf. Des Weiteren ist die Inkubationsdauer für HT-29 Zellen aufgrund ihrer abweichenden Wachstums- und Teilungsrate anders als die der anderen Zelllinien.

Insgesamt unterliegt diese Versuchsreihe hohen Schwankungen. Es gab zum Beispiel vereinzelte Versuchsdurchgänge, bei denen eine Konzentration von 100 μ M keinen Effekt auf die Zellen zeigte. Das Mestranol unterliegt einer sehr hohen Schwankung während der Aktivierung und zeigt eine ausgeprägte Bindung an Albumin, worauf auch die Unterschiede in den Versuchsdurchgängen zurückgeführt werden. [120] Kleine Konzentrationsänderungen der Substanz und FCS, die genaue Zellzahl als auch die Außentemperatur haben Einfluss auf den Stoffwechsel der Zellen und können somit eine Metabolisierung beeinflussen. Mit einer Aktivität zwischen 9 und 50 μ M und wegen der schwankenden Ergebnisse kann nicht von einer Selektivität gesprochen werden. Die Möglichkeit, die Aktivität durch die Einführung von Gold(I) zu steigern, besteht aber weiterhin.

Substanz	Kurzname	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231	RC-124
11	Im-Methyl-Au-Cl	25,4 ^{±3,6}	14,7 ^{±3,6}	22,3 ^{±4,2}	14,2 ^{±3,0}
12	Im-Ethyl-Au-Cl	14,9 ^{±3,9}	6,5 ^{±2,9}	10,6 ^{±3,5}	9,8 ^{±4,5}
13	HB-Methyl-Au-Cl	10,8 ^{±0,9}	6,2 ^{±1,4}	8,8 ^{±1,0}	9,1 ^{±4,2}
14	HB-Ethyl-Au-Cl	11,8 ^{±2,5}	5,9 ^{±1,4}	9,6 ^{±0,3}	5,2 ^{±0,8}
15	MB-Methyl-Au-Cl	11,1	10,2	10,4	n.b.
16	MB-Ethyl-Au-Cl	3,1 ^{±0,3}	3,1 ^{±0,3}	2,7 ^{±0,6}	2,2 ^{±0,7}
17	EB-Methyl-Au-Cl	17,3 ^{±0,2}	14,3 ^{±4,5}	9,2 ^{±2,3}	10,6 ^{±1,6}
18	EB-Ethyl-Au-Cl	10,9 ^{±1,9}	7,4 ^{±2,6}	6,3 ^{±1,9}	7,8 ^{±0,9}
19 [169]	FB-Ethyl-Au-Cl	11,6 ^{+/-1,5}	9,1 ^{+/-1,9}	10,9 ^{+/-0,2}	8,8 ^{+/-0,3}

Tabelle 14 IC₅₀-Werte [μ M] der NHC-Au(I)-Cl (11 - 19) gegen die vier untersuchten Zelllinien

Die NHC-Au(I)-Cl sollten im Vergleich zu den Vorstufen eine Wachstumsinhibition auf die Zellen zeigen, da durch den Metalleinbau ein aktives Agens eingeführt wird. Dieser Effekt kann wie erwartet beobachtet werden. Die NHC-Au(I)-Cl zeigen IC₅₀-Werte im Bereich 2 bis 25 μ M (Tabelle 14) und sind somit deutlich aktiver als ihre Vorstufen. Mit einer geringen Tendenz zeigen die ethylierten NHC-Au(I)-Cl eine höhere Aktivität gegenüber allen getesteten Zelllinien. Eine Selektivität gegenüber den Tumorzellen ist nicht erkennbar. Komplex 16 zeigt in dieser Reihe insgesamt die stärkste Aktivität.

In Kapitel 2.1 und 2.2 werden vier Serien von NHC-Au(I)-Alkinen definiert. Für die Auswertung der biologischen Daten wird diese auf der Synthesereihenfolge basierende Einteilung nicht genutzt. Die Komplexe werden in Serie 1 MA, Serie 2 FA, Serie 3 HA und Serie 4 mit Mestranol als Alkinliganden unterteilt. Diese Änderung ermöglicht es, die Strukturwirkungsbeziehungen leichter zu überblicken.

Durch Einführen des Alkinliganden wird eine weitere Aktivitätssteigerung erhofft. Tabelle 15 zeigt die IC₅₀-Werte der Komplexe 20 - 28. Als erstes fällt auf, dass einige Komplexe durch die Einführung des zweiten Liganden ihre Aktivität verlieren oder deutlich höhere Konzentrationen nötig sind, um das Wachstum der Zellen zu inhibieren. Das erscheint auf den ersten Blick negativ, da die neuen Zielstrukturen nicht alle einen Effekt auf das Wachstum von Krebszellen zeigen. Allerdings kann man aus den unterschiedlichen Ergebnissen der Komplexe Schlüsse auf mögliche Strukturwirkungsbeziehungen ziehen.

Substanz	Kurzname	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231	RC-124
20	Im-Methyl-Au-MA	> 100	25,6 ^{±3,5}	20,2 ^{±0,0}	35,5 ^{±6,7}
21	Im-Ethyl-Au-MA	25,8 ^{±2,8}	5,9 ^{±2,5}	22,5 ^{±1,7}	14,1 ^{±3,0}
22	HB-Methyl-Au-MA	> 100	> 100	33,6 ^{±17,4}	> 100
23	HB-Ethyl-Au-MA	1,5 ^{0,4}	0,7 ^{±0,3}	0,8 ^{±0,3}	1,5 ^{±0,8}
24	MB-Methyl-Au-MA	2,7 ^{±0,2}	3,8 ^{±1,7}	1,0 ^{±0,5}	4,2 ^{±3,7}
25	MB-Ethyl-Au-MA	0,8 ^{±0,1}	0,4 ^{±0,2}	0,6 ^{±0,4}	0,6 ^{±0,1}
26	EB-Methyl-Au-MA	> 100	> 100	15,5 ^{±2,8}	> 100
27	EB-Ethyl-Au-MA	> 100	> 100	> 100	26,1 ^{±10,0}
28	FB-Ethyl-Au-MA	27,5 ^{±2,8}	19,4 ^{±4,2}	17,9 ^{±6,5}	8,6 ^{±3,6}

Tabelle 15 IC₅₀-Werte [μ M] der ersten Serien (20 - 28) von NHC-Au(I)-Alkine

Eine Selektivität gegenüber den drei Krebszelllinien ist nicht zu erkennen, aber die MDA-MB-231-Zellen scheinen bis auf einzelne Ausnahmen anfälliger auf die Komplexe zu reagieren als HT-29 und MCF-7.

Die Komplexe 23, 24 und 25 sind in dieser Serie deutlich aktiver als alle anderen Vertreter und Komplex 24 der einzige Methylierte mit einem guten antiproliferativen Effekt. Die methylierten Komplexe der ersten Serie scheinen im Schnitt eine geringere Aktivität zu zeigen als die ethylierten Partner. Dies war auch bei den NHC-Au(I)-Cl zu erkennen. Rubbiani et al. zeigten ebenfalls eine solche Tendenz der getesteten Komplexe. [116]

Außerdem fallen Komplex 26 und 27, die an 5-Position einen Ester tragen, hier besonders auf, da sie beide keine erwähnenswerte Aktivität zeigen. Der Substituenteneinfluss scheint sich im NHC-Au(I)-Cl (Komplexe 17 und 18) nur minimal zu zeigen, wohingegen die entsprechenden NHC-Au(I)-Alkine nicht aktiv sind. Die Komplexe könnten zudem viel zu lang sein, um in die Zelle zu gelangen oder um mit ihrem Target zu interagieren. Sie könnten auch zerfallen, da die Donoreigenschaften des NHCs verändert sind und die Stabilität dadurch beeinflusst wird. Die beiden Komplexe zeigen im Vergleich zu allen anderen getesteten Substanzen zusätzlich Löslichkeitsprobleme und können nur im Ultraschallbad für die Versuche in Lösung gebracht werden.

In der zweiten Serie (siehe Tabelle 16) der NHC-Au(I)-Alkine mit Fluorrest an 4-Position des Alkins zeigt Komplex **30** gute antiproliferative Effekte um 3 μM . Die Kombination von Fluoralkin mit Benzimidazol oder Fluorbenzimidazol zeigt IC_{50} -Werte um 30 μM , was keiner starken Aktivität entspricht.

Substanz	Kurzname	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231	RC-124
29	HB-Ethyl-Au-FA	44,5 \pm 7,1	37,4 \pm 1,2	40,8 \pm 11,9	5,9 \pm 1,9
30	MB-Ethyl-Au-FA	3,5 \pm 0,7	1,5 \pm 0,4	4,0 \pm 0,8	0,2 \pm 0,0
31	FB-Ethyl-Au-FA	38,2 \pm 3,6	23,3 \pm 1,5	22,2 \pm 7,5	9,9 \pm 4,3

Tabelle 16 IC_{50} -Werte [μM] der zweiten Serien (**29** - **31**) NHC-Au(I)-Alkine mit FA

Die dritte Serie mit unsubstituiertem Alkin war am schwierigsten zu synthetisieren und die Ausbeuten reichten nicht bei allen Komplexen für eine biologische Untersuchung. Komplex **32** zeigt keine auffällige Aktivität, während Komplex **33** in einem ersten Versuch den Aktivitätsbereich der stärker aktiven Komplexe erreicht (siehe Tabelle 17).

Substanz	Kurzname	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231	RC-124
32	HB-Ethyl-Au-HA	26,4 \pm 14,1	14,7 \pm 4,2	16,1 \pm 7,3	2,9 \pm 2,1
33	MB-Ethyl-Au-HA	> 100	5,3	9,5	0,5
34	FB-Ethyl-Au-HA	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

Tabelle 17 IC_{50} -Werte [μM] der dritten Serien (**32** - **34**) NHC-Au(I)-Alkine mit HA

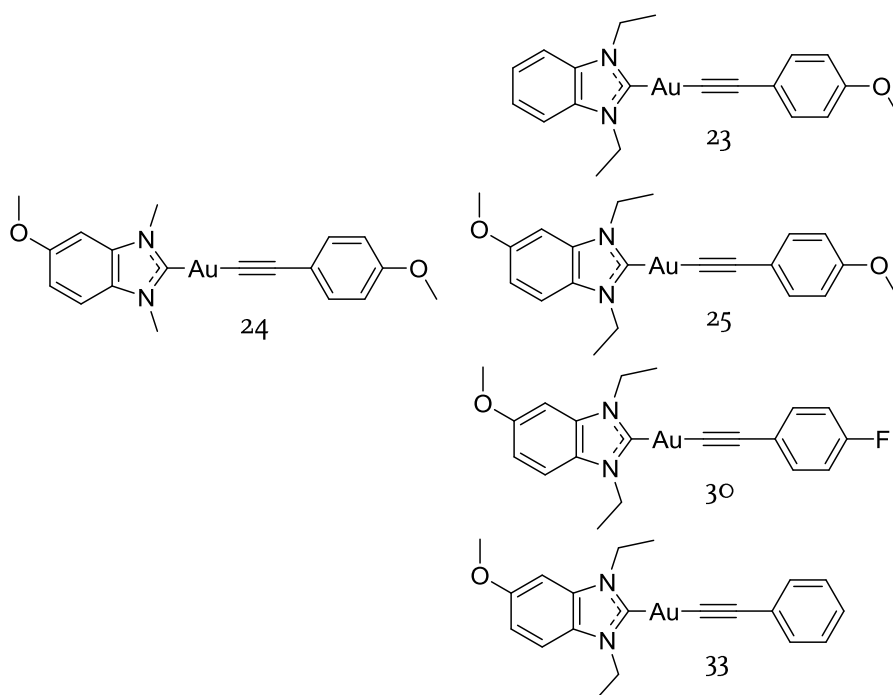


Abbildung 52 Auswahl aktivster Vertreter der NHC-Au(I)-Alkine

Starke antiproliferative Eigenschaften besitzen somit Komplexe 23, 24, 25, 30 und 33 (siehe Abbildung 52). Es fällt auf, dass die Kombination mit Methoxybenzimidazol in jeder Serie die höchste Aktivität zeigt. Auf NHC-Seite scheint somit das ethylierte 5-Methoxybenzimidazol die besten antiproliferativen Eigenschaften zu haben.

Das unsubstituierte Benzimidazol sowie das 5-Fluorbenzimidazol erreichen vergleichbare Aktivitäten, während das veresterte Benzimidazol an Aktivität verliert.

Die drei getesteten Alkine zeigen zwar in den Endkomplexen unterschiedliche Aktivitäten, die Aktivitätsunterschiede sind aber nicht so ausgeprägt wie im NHC-Vergleich. Die Hauptaktivität scheint somit durch den NHC-Liganden bestimmt zu werden.

Eine Besonderheit der Zellkultur muss an dieser Stelle diskutiert werden. Wie bereits erwähnt, mussten während der Versuche unterschiedlich alte Zelllinien verwendet werden. Zelllinien haben trotz Immortalisierung nur eine begrenzte Nutzungszeit, die von der jeweiligen Zellart sowie Passagehäufigkeit abhängig ist. Bei der natürlichen Zellteilung kommt es zu Mutationen und Verkürzung der Telomere, wodurch die Zellen altern, bis der kontrollierte Zelltod (Apoptose) eintritt. [170] Die Apoptose ist ein natürlicher Mechanismus, um den Organismus von defekten Zellen zu befreien. Primärkulturen lassen sich durch diese Regulation nur bis zum Hayflick-Limit (ca. 50 Verdopplungen) passagieren. [171–173] Bei Zelllinien ist dieser Kontrollmechanismus ausgeschaltet. Man spricht von der erwähnten Immortalisierung, die auf verschiedenen Wegen initiiert werden kann. Während der Zellkultivierung wachsen und teilen sich die Zellen meist bis zu einem Monolayer (eine Schicht von direkt aneinander liegenden Zellen) und werden dann wieder vereinzelt. Jede Passage und die dadurch angeregte Zellteilung führt zu einer Veränderung der ursprünglichen Zellen durch zufällige Mutation. Dies ist bis zu einem gewissen Grad irrelevant. Kultiviert man Zelllinien jedoch zu lange, kann es passieren, dass das Ursprungsgenom so stark verändert wird, dass die Zellen Mutationen aufweisen, die zu veränderter Morphologie oder einem veränderten Stoffwechsel führen. Dieses Phänomen der Langzeitkulturen nennt man auch genetischen bzw. phenotypischen Drift. In diesem Stadium verhalten sich die Zellen nicht mehr wie am Anfang ihrer Nutzung.

Je nach Zelllinie wird im Schnitt eine Kulturerneuerung nach 20 bis 30 Passagen empfohlen. Es ist deshalb wichtig zu wissen, wie alt eine Zellkultur ist. Diese muss nach einer gewissen Zeit wieder erneuert werden, da die zellbiologischen Ergebnisse sonst schwanken können.

Zusätzlich zur Zellkulturalterung innerhalb einer Kultur können Kryokulturen von verschiedenen Chargen der Originalkultur stammen, was ebenfalls eine kleine Variation im Genom bedeuten kann. Dies wird von den Zelllieferanten so gering wie möglich gehalten. Die Aufbewahrung von Zelllinien in Kryokulturen unterliegt ebenfalls einer gewissen zeitlichen Einschränkung und Unterschieden in der Methodik. Dies hat zusätzlich Einfluss auf die Zellteilungsrate der genutzten Zelllinien. [172]

Im Verlauf dieser Arbeit fand ein großer Kulturwechsel statt. Die Versuche für die erste Serie wurden an sehr lang kultivierten Zellen (grau) durchgeführt und alle anderen Komplexe wurden auf neu erworbenen Chargen (weiß) getestet. Dies kann wie beschrieben einen Einfluss auf die Ergebnisse und die Vergleichbarkeit haben. Betrachtet man die Serien untereinander, fällt auf, dass Serie 1 etwas kleinere IC₅₀-Werte erreicht. An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob diese Tendenz allein in den Komplexen begründet liegt oder ob die erneuerten Kulturen einen Anteil daran haben. Um zu ermitteln, ob die neuen Zellen deutlich unterschiedlich auf die Komplexe reagieren, wird der IC₅₀-Wert für Komplex 25 erneut bestimmt (siehe Tabelle 18).

Substanz	Kurzname	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231	RC-124
25 alt	MB-Ethyl-Au-MA	0,8 ^{±0,1}	0,4 ^{±0,2}	0,6 ^{±0,4}	0,6 ^{±0,1}
25 neu	MB-Ethyl-Au-MA	6,6 ^{±1,1}	2,4 ^{±0,2}	6,0 ^{±2,4}	0,3 ^{±0,1}
30	MB-Ethyl-Au-FA	3,5 ^{±0,7}	1,5 ^{±0,4}	4,0 ^{±0,8}	0,2 ^{±0,0}
33	MB-Ethyl-Au-HA	> 100	5,3	9,5	0,5

Tabelle 18 IC₅₀-Werte [μM] von Komplex 25 für alte und neue Zellchargen und Komplex 30 und 33 im Vergleich

Bis auf RC-124, die nur mit einer Charge getestet wurden, zeigen die neuen Zellen 6- bis 10-mal höhere IC₅₀-Werte. Dies erscheint zunächst sehr hoch, jedoch sind im tiefen mikro- bis nanomolaren Bereich größere Schwankungen durch Einwiege-, Verdünnungs- und Pipettenfehler, etc. normal. Relative Standardabweichungen bis 25 % sind für biologische Versuche mit Kulturbeteiligungen und den vielen beteiligten Methoden akzeptabel. Hierzu wird in Abschnitt 7.1 eine genauere Erklärung gegeben.

Für die Bewertung einer Substanz ist der Bereich des IC₅₀-Wertes ausschlaggebend. Das schlechtere Ergebnis an den neuen Zellen ändert nichts an der Aussage, dass Komplex 25 zu den aktivsten der getesteten NHC-Au(I)-Alkine zählt. Vergleicht man nun die Ergebnisse für die verschiedenen Alkine kombiniert mit dem ethylierten 5-Methoxybenzimidazol, lässt sich für Komplex 30 eine minimal bessere Aktivität erkennen. Das entspricht aber nur einer Tendenz,

die Komplexe 23, 24, 25, 30 und 33 sind somit mit IC₅₀-Werten im einstelligen mikromolaren Bereich die aktivsten der Klasse.

Substanz	Kurzname	HT-29
23	HB-Ethyl-Au-MA	1,5 ^{0,4}
25	MB-Ethyl-Au-MA	0,8 ^{±0,1}
29	HB-Ethyl-Au-FA	44,5 ^{±7,1}
30	MB-Ethyl-Au-FA	3,5 ^{±0,7}
Ref1	HB-Ethyl-Au-TPP	0,4 ^{±0,2} [116]
HB-Ethyl-Au-TEP	HB-Ethyl-Au-TEP	8,9 ^{±0,1} [116]
MB-Ethyl-Au-TPP	MB-Ethyl-Au-TPP	6,2 ^{±2,0} [116]
MB-Ethyl-Au-TEP	MB-Ethyl-Au-TEP	3,9 ^{±1,5} [116]
Ref2	TPP-Au-MA	5,0 ^{±0,3} [60]
Ref3	TEP-Au-MA	10,8 ^{±2,2} [60]
TPP-Au-FA	TPP-Au-FA	1,6 ^{±0,7} [60]
TEP-Au-FA	TEP-Au-FA	8,9 ^{±2,3} [60]
Auranofin	-	3,8 ^{±0,2} [169]

Tabelle 19 IC₅₀-Werte [μM] ausgewählter Vertreter der drei Komplexklassen im Vergleich

Die NHC-Au(I)-Alkine sollen in dieser Arbeit mit den NHC-Au(I)-Phosphanen sowie den Phosphan-Au(I)-Alkinen verglichen werden. Dieser Vergleich soll exemplarisch an den Aktivitäten gegenüber HT-29-Zellen erfolgen (Tabelle 19). Dabei werden die jeweils ethylierten Benzimidazole und 5-Methoxybenzimidazole in Kombination mit Methoxy- und Fluoralkin gezeigt.

Die Klasse der NHC-Au(I)-Phosphane unterscheidet sich von den beiden anderen Klassen durch ihre positive Ladung, wodurch die Aufnahme in die Zelle sowie der Wirkort und die möglichen Targets abweichen können. Trotzdem ist ein Vergleich der antiproliferativen Effekte interessant, um die Klassen untereinander einschätzen zu können. Die gezeigten Vertreter sind fast alle gute Proliferationsinhibitoren der HT-29-Zellen. Jede Klasse weist Komplexe auf, die eine geringere Wirkung zeigen. Komplex 29 ist ein solches Beispiel, sonst zeigen alle Komplexe und Referenzen aus Tabelle 19 eine Inhibition im niedrigen mikromolaren Bereich. Die NHC-Au(I)-Alkine erreichen somit mit den entsprechenden Liganden ähnliche Aktivitäten wie die beiden Vergleichsklassen. Im Vergleich zu weiteren interessanten Verbindungen wie Auranofin sind die NHC-Au(I)-Alkine ebenfalls positiv einzuschätzen. Die neue Komplexklasse stellt somit eine neue Ligandenkombination dar, die verschiedene Tumorzelllinien aktiv in Wachstum und Zellteilung hemmt und Aktivitäten erreicht, die auch andere potentielle Vertreter der Gold(I)-Komplexe zeigen.

Die in Kapitel 3 gezeigten Daten ermöglichen eine Abschätzung der Aktivität der NHC-Au(I)-Alkine. Ob die berechneten Aktivitäten zu den gemessenen Ergebnissen passen, wird im Folgenden erläutert.

Laut den berechneten Dipolmomenten sollten die Komplexe mit Methoxyrest auf NHC-Seite und Fluorrest auf Alkinseite die reaktivsten der Klasse sein. Dies spricht für eine hohe Aktivität von stark polarisierten Komplexen, wie z.B. Komplex 30. Die Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchungen bestätigen diese Annahme. Die Ergebnisse der verschiedenen NHC-Grundkörper passen ebenfalls grob zu der berechneten Reaktivitätsabfolge. Die 5-Methoxy-NHCs sind am aktivsten, darauf folgt das unsubstituierte Benzimidazol und Imidazol und das 5-Fluor-NHC schließt sich an. Die an 5-Position veresterten NHCs sind inaktiv. Auf Alkinseite scheinen die Ergebnisse ebenso wie die Berechnungen keiner Regelmäßigkeit zu unterliegen. Die NHC-Liganden haben auch im Zytotoxizitätstest einen größeren Einfluss auf die Aktivität als ihre Alkinpartner, was sich schon aus den Ergebnissen der Berechnungen herauskristallisierte (siehe Kapitel 3.2 und 3.3). Die Stabilität der einzelnen Bindungen scheint ebenfalls mit der Aktivität zu korrelieren. Dies deutet darauf hin, dass eine gewisse Stabilität nötig ist, damit die Komplexe eine Aktivität entwickeln können. Die ethylierten Komplexe weisen laut Berechnungen etwas stabilere Bindungen als die methylierten Partner auf. Das könnte die Komplexe vor Nebenreaktionen schützen und so die minimal bessere Aktivität der ethylierten Komplexe erklären. Die berechneten Daten passen nicht in jedem Detail zu den ermittelten Aktivitäten, dies war aber auch nicht zu erwarten. Die Tendenzen, die sich theoretisch und praktisch erkennen lassen, passen aber durchaus zueinander, was positiv zu bewerten ist.

Die Kopplung mit Mestranol führt zu aktiven Komplexen, die aktiver als das Mestranol allein sind. Im Vergleich zu den NHC-Au(I)-Cl-Vorstufen ist die Aktivität etwas geringer. Die Löslichkeit der Komplexe ist deutlich schlechter als die der anderen Vertreter, sodass die beiden Komplexe im Ultraschallbad gelöst werden müssen. Die Ergebnisse sind schwer zu interpretieren, da die Komplexe zwar aktiver sind als das Mestranol, aber weniger aktiv als die NHC-Au(I)-Chloride (siehe Tabelle 20). Dies deutet darauf hin, dass die beiden Verbindungen sich anders verhalten als die jeweiligen Vorstufen. Auch der Mestranolalkinligand hat Einfluss

auf die Aktivität, da im Vergleich zum Chloridoliganden andere IC_{50} -Werte erreicht werden. Die Aufnahme könnte durch den Mestranolliganden verändert sein, wodurch der Zielort nicht oder schwerer erreicht wird. Die Interaktion mit Zielstrukturen wie der TrxR wird durch Einführung eines so großen Liganden mit hoher Wahrscheinlichkeit beeinflusst. Es ist ebenfalls möglich, dass eine Dissoziation der Komplexe anders verläuft und die Interaktion mit Zielstrukturen dadurch verändert wird.

Die Aktivität gegenüber MCF-7-Zellen ist im Vergleich zum Mestranol allein deutlich höher. Gewebespezifische Eigenschaften sind jedoch weiterhin nicht zu erkennen, da die Komplexe gegenüber allen vier Zelllinien vergleichbare Aktivitäten zeigen. Eine Gewebeselektivität wird somit nicht erreicht.

Die Komplexe 35 und 36 zeigen im Vergleich zu Mestranol keine starken Schwankungen, was auf eine gewisse Stabilität bzw. andere Prozesse der Verstoffwechslung in den Zellen hindeutet. Das 5-Methoxybenzimidazol ist auch in Kombination mit Mestranol aktiver als das unsubstituierte Benzimidazol, was zu den Ergebnissen der restlichen Komplexe passt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mit Mestranol gekoppelten Komplexe zwar eine Aktivität zeigen, diese jedoch die Chlorido-Vorstufen nicht übersteigt und eine Gewebeselektivität nicht erkennbar ist.

Substanz	Kurzname	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231	RC-124
Mestranol	-	$9,0^{\pm 2,0}$	$49,4^{\pm 13,2}$	$24,8^{\pm 3,1}$	> 100
14	HB-Ethyl-Au-Cl	$11,8^{\pm 2,5}$	$5,9^{\pm 1,4}$	$9,6^{\pm 0,3}$	$5,2^{\pm 0,8}$
16	MB-Ethyl-Au-Cl	$3,1^{\pm 0,3}$	$3,1^{\pm 0,3}$	$2,7^{\pm 0,6}$	$2,2^{\pm 0,7}$
35	HB-Ethyl-Au-Mestranol	$10,3^{\pm 0,4}$	$17,1^{\pm 1,0}$	$23,5^{\pm 4,9}$	$4,8^{\pm 1,7}$
36	MB-Ethyl-Au-Mestranol	$11,4^{\pm 3,0}$	$5,3^{\pm 1,6}$	$10,0^{\pm 5,4}$	$0,4^{\pm 0,2}$

Tabelle 20 IC_{50} -Werte [μM] der beiden an Mestranol gekoppelten Komplexe (35 und 36)

5.2 Morphologische Beobachtungen und Wachstumsuntersuchungen

Der Einfluss auf Zellen kann nicht nur über den IC_{50} -Wert betrachtet werden. Beeinflussen Wirkstoffe das Zellwachstum, die Zellteilung oder die Morphologie, kann dies mit neuen Methoden wie dem *Live-Cell-Imaging* untersucht werden. Aufnahmen einzelner Zellen oder eines Zellrasens während der Inkubation ermöglichen hier vielfältige Untersuchungen. Wachstumskurven können zeigen, ob die behandelten Zellen direkt von den Wirkstoffen beeinflusst werden oder ob zum Beispiel eine gewisse Inkubationszeit nötig ist. Die Frage, ob eine Substanz zytostatisch oder sogar zytotoxisch wirkt, kann ebenfalls untersucht werden (Abbildung 53). Analog zum IC_{50} -Wert ist eine Verbindung zytostatisch, wenn sie das Wachstum bzw. die Zellteilung der Zellen hemmt und dadurch die Konfluenz langsamer oder gar nicht mehr zunimmt. Im Vergleich dazu führt eine zytotoxische Verbindung zur Reduzierung der Konfluenz und somit zu einer fallenden Wachstumskurve.

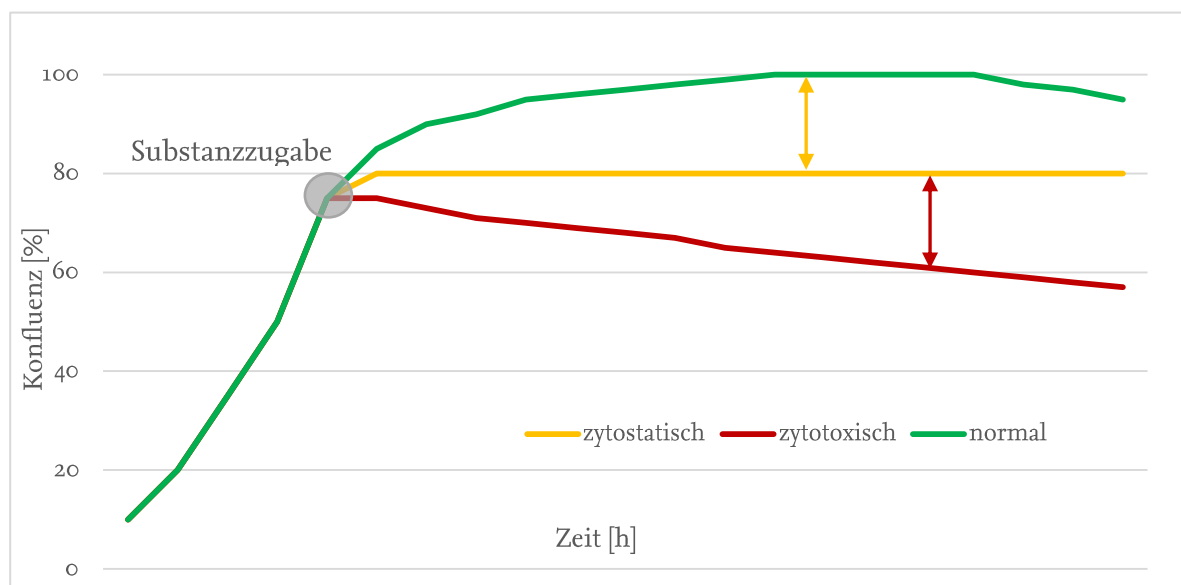


Abbildung 53 Schematische Darstellung der Konfluenz in Abhängigkeit von der Zeit

Manche Substanzen beeinflussen die Oberfläche und Struktur der Zellen. Solche morphologischen Veränderungen können mittels Kamera oder Mikroskop ebenfalls beobachtet werden. Die Bewegung von Zellen über Zell-Zell-Kontakte oder Zellfortsätze kann zudem eingeschränkt werden und so Wachstum und Teilung der Zellen reduzieren.

Mit Etablierung einer Inkubatorkamera im Arbeitskreis ist es möglich, erste visuelle Untersuchungen an Zellen durchzuführen, die mit den Metallkomplexen behandelt werden. Hierfür werden Wachstumskurven von HT-29-Zellen unter Komplexeinfluss aufgenommen. Komplex 23, der einen niedrigen IC_{50} -Wert zeigt, und Komplex 20, eine Goldverbindung ohne antiproliferativen Effekt, dienen dabei als Testkomplexe. DMF als Kontrolle soll zum Vergleich eine ungestörte Wachstumskurve zeigen. Die untersuchte Konzentration beträgt $5\text{ }\mu\text{M}$, die Ergebnisse sind in Abbildung 54 zusammengefasst.

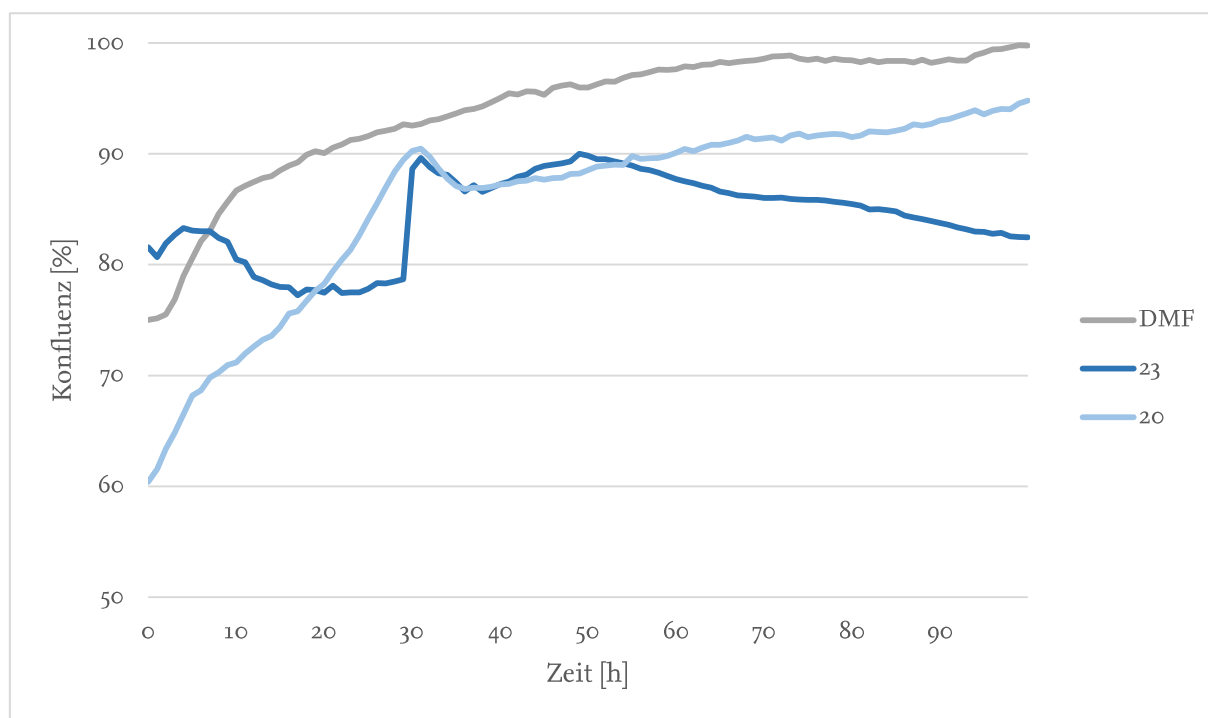


Abbildung 54 Konfluenz [%] in Abhängigkeit zu Zeit [h] der Lösemittelkontrolle DMF (grau), Komplex 20 (hellblau) und Komplex 23 (blau)

Es lässt sich erkennen, dass die Zellen unter Einfluss von DMF (grau) und Komplex 20 (hellblau) ein normales Wachstum zeigen. Die Teilungsrate und Massezunahme sind bei hoher Konfluenz natürlicherweise langsamer, aber die Zellen teilen sich weiter, bis ein kompletter Zellrasen entsteht.

Unter Inkubation mit Komplex 23 (blau) zeigen die Zellen zunächst einen Stillstand des Wachstums bzw. sogar eine leichte Erniedrigung der Konfluenz, bis nach ca. 30 h ein kleiner Sprung eintritt. Dieser Sprung könnte zum einen auf dem einfachen Fehler beruhen, dass der Brutschrank geöffnet wurde und der Ruck der Tür das Bild verschoben hat. Dieser Fehler wurde während der ersten Tests mit der Inkubatorkamera erkannt und kann mit gut geplanter Brutschrankbelegung und Kommunikation im Team vermieden werden. Zum anderen könnten

die Zellen in dieser Zeit eine Anpassung des Stoffwechsels an den erhöhten Stress initiiert haben. Diese Anpassung reicht jedoch nicht aus, sodass das Wachstum danach wieder komplett zum Stillstand kommt. Zum Ende wird der Zellrasen sogar kleiner.

Die Kurve von Komplex 20 zeigt nach 30 h ebenfalls eine Veränderung der Konfluenz, was die Anpassungstheorie unterstützt, jedoch durch die Inaktivität des Komplexes am Ende zu einem komplett anderen Ergebnis führt.

Komplex 23 inhibiert nicht nur sichtlich das Wachstum. Schaut man sich die Zellaufnahmen genauer an, wird deutlich, dass die Zellen viel kleiner sind und zusammengeschrumpft wirken (Abbildung 55). Das veränderte Aussehen der Zellen scheint keine Veränderung der Morphologie bei aktivem Stoffwechsel zu sein, sondern stellt wahrscheinlich die Kugelform bei Zelltod dar. Dieses Schrumpfen der Zellen kann den abfallenden Verlauf der Wachstumskurve erklären, denn die Kamera erfasst immer noch einen Zellrasen, dessen Fläche allerdings kleiner wird.

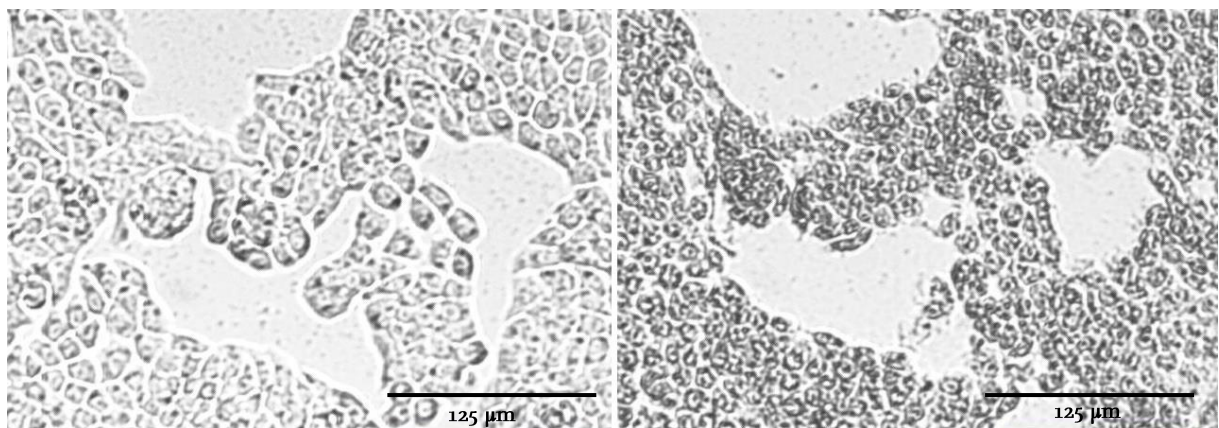


Abbildung 55 HT-29 bei 0 h (links) und 96 h (rechts) unter Inkubation mit Komplex 23

Wenn man die Flaschen aus dem Inkubator herausnimmt, ist zu beobachten, dass die Adhäsionsfähigkeit der Zellen komplett verloren gegangen ist, denn der Zellrasen lässt sich durch minimales Schwenken vom Flaschenboden lösen. Dies ist bei vitalen Zellen nicht der Fall. Das Medium der Flasche ist im Vergleich zu Kontrolle und Komplex 20 unverändert rosa gefärbt.

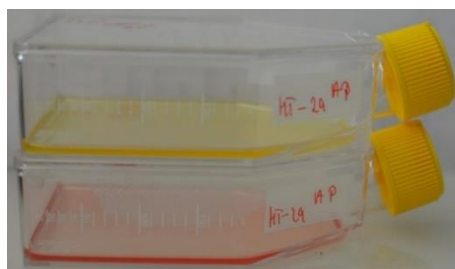


Abbildung 56 Vergleich der Indikatorfarbe von DMF-Kontrolle (oben) und Komplex 23 (unten) nach der Inkubation zur Aufnahme der Wachstumskurven

Der Indikator des Mediums ist eine gute Kontrolle für den Nährstoffverbrauch der Zellen und ihren aktiven Stoffwechsel, da beides den pH-Wert erniedrigt und der Indikator unterhalb einem pH-Wert von 7,3 von rosa zu gelb umschlägt. Die mit Komplex 23 behandelten Zellen zeigen ein unverändertes rosa Medium, was auf ein reduziertes Wachstum und einen heruntergefahrenen Stoffwechsel hindeutet (Abbildung 56).

Komplex 23 zeigt somit durch den niedrigen IC_{50} -Wert, die sinkende Wachstumskurve, den heruntergefahrenen Stoffwechsel und das kugelige Aussehen der Zellen, dass er die Kolonzen stark in Wachstum und Teilung inhibiert und wahrscheinlich auch zytotoxische Eigenschaften besitzt.

Eine weitere Eigenschaft von gesunden Zellen ist die Fähigkeit zur Migration, also das Bewegen der Zellen durch Zellfortsätze oder Zell-Zell-Kontakte. MDA-MB-231-Brustkrebszellen zeigen diese Fähigkeit in hohem Maß. Dies ermöglicht eine Untersuchung des Einflusses der Komplexe auf die Zellmigration und Aussagen über eine mögliche Einschränkung der Zellen. [122] Der sogenannte *Scratch*-Assay ist eine gängige Methode, um den Einfluss auf die Migrationsrate von Zellen zu betrachten. [174, 175] Hierfür wird in einen konfluenten Zellrasen eine Linie (Wunde, *Scratch*) gezogen und betrachtet, wie die Zellen dieses Loch wieder mit Zellmasse auffüllen. Die Ergebnisse für Komplex 23 mit seinem IC_{50} -Wert sind in Abbildung 57 zu sehen, ergänzend zeigt Abbildung 58 das Zuwachsen der Wunde im Zellrasen.

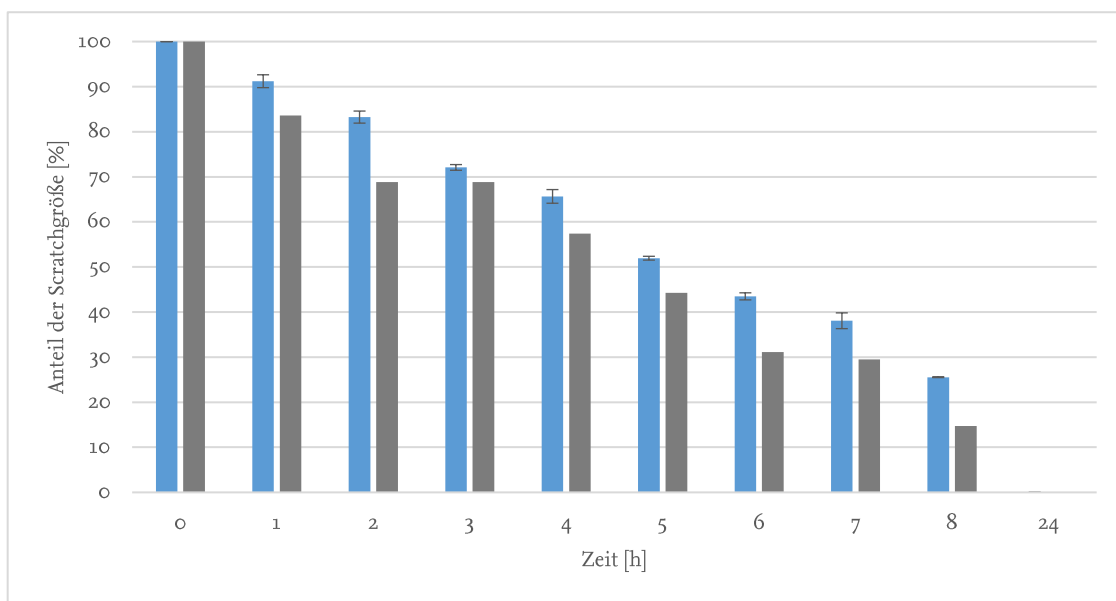


Abbildung 57 Anteil der Wundgröße [%] im Verlauf von 24 h von Komplex 23 (blau) und DMF (grau)

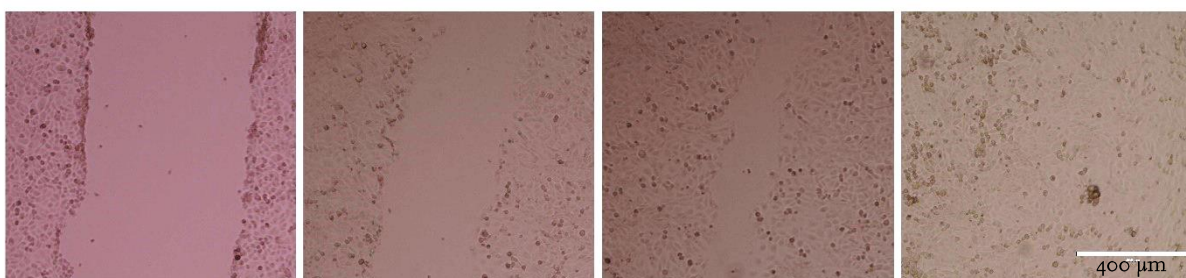


Abbildung 58 Zellrasen mit Wunde bei 0, 4, 8 und 24 h (von links nach rechts) behandelt mit Komplex 23 mit dem IC_{50} -Wert als Inkubationskonzentration

Die Wunde schließt sich mit DMF als Kontrolle schneller als mit Komplex 23. Dies stützt weiter die Annahme, dass der Komplex die Teilungsrate und das Wachstum reduziert. Ein Einfluss auf die Migration der Zellen kann für Komplex 23 und DMF in den mikroskopischen Aufnahmen nicht beobachtet werden, sodass hierzu keine Aussagen getroffen werden können. Man sieht während des gesamten Versuchs keine Neigung der Brustkrebszellen, in den Freiraum zu migrieren. Die Wunde wird über Zellteilung und Zellwachstum geschlossen.

Zusammenfassend kann man für Komplex 23 als aktiven Vertreter der NHC-Au(I)-Alkine sagen, dass die Komplexe Einfluss auf Wachstum und Zellteilung haben. Der Stoffwechsel scheint nicht mehr zu funktionieren. Die Zellmorphologie ändert sich zur Kugelform und die Adhäsionsfähigkeit nimmt ab. Die mangelnde Zellteilung, die kugelige Form der Zellen und das unverbrauchte Medium deuten auf einen gestoppten Stoffwechsel bis hin zur Apoptose hin. Der Komplex scheint auch zytotoxische Eigenschaften zu haben.

5.3 Interaktion mit Zellkulturproteinen

Wirkstoffe gelangen nicht einfach nur in den Magendarmtrakt oder direkt in die Blutbahn und dann zum eigentlichen Wirkort. Sie unterliegen oft Interaktionen mit körpereigenen Substanzen, verschiedenen Transportmechanismen oder sogar einem Stoffwechselprozess, wie man es von Prodrugs kennt. Innerhalb der Zellkultur ist die Passage der Zellmembran ebenfalls nicht das einzige kritische und gleichzeitig interessante Ereignis. Da für ein gleichmäßiges und vergleichbares Wachstum innerhalb der Zellkultur standardisiertes fetales Kälberserum (FCS) genutzt wird, findet oft bereits im Medium eine Interaktion zwischen den FCS-Proteinen und der Testsubstanz statt. [172] Die genutzten Medien in der Zellkultur sind standardisierte Nährstofflösungen wie das *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) [176], die jedoch ohne Zusatz von FCS kein einheitliches Wachstum der Zellen gewährleisten oder ohne Antibiotikazusatz schnell kontaminieren. FCS wird aus dem Blut von Kälberföten gewonnen und ist ein Gemisch aus Transportproteinen, wie z.B. Albumin (BSA, *bovine serum albumin*) oder Transferrin, Adhäsions- und Wachstumsfaktoren, Enzymen, Hormonen u.v.m, sodass eine Vielzahl von Interaktionen oder Reaktionen möglich sind, bevor eine Testsubstanz in Kontakt mit den Zielzellen kommt.

Es gibt verschiedene Interaktionsmöglichkeiten und je nach Wirkstoff sind diese auch sehr unterschiedlich ausgeprägt. Besteht zum Beispiel eine sehr starke Bindung an Transportproteine des FCS, kann dies Einfluss auf die Aufnahme in die Zellen haben. Je nach Affinität können Substanzen sogar so stark an diese Proteine binden, dass die Aufnahme in die Zelle minimiert wird. Es gibt aber auch Mechanismen, bei denen eine Bindung an Transportproteine zu einer verbesserten Aufnahme führt. [177] Man kann mit Untersuchungen dieser Interaktion keine direkten Voraussagen über eine Bioverteilung treffen, aber sie helfen, die Interaktion und das Verhalten in der Zellkultur zu verstehen.

Für diesen Versuch wird Zellkulturmedium mit einer definierten Menge FCS bzw. BSA versetzt. Die Komplexe werden in einer definierten Konzentration (z.B. IC_{50} -Wert, 3 μ M oder 5 μ M) hinzugegeben und die Mischung bei 37 °C inkubiert. Proben werden, abhängig von Metall und Liganden, zu definierten Zeitpunkten gezogen. Die enthaltenen Proteine werden mittels Ethanolpräzipitation gefällt. Der Goldgehalt kann im Überstand mittels HR-CS AAS bestimmt

werden (siehe Kapitel 8.6.13 und 8.6.14). Der an das Protein gebundene Anteil ergibt sich indirekt aus der Differenz von Gesamtmenge an Komplex und gemessenem Restgehalt im Überstand.

Zunächst wird die Bindung von Komplex 23 zu FCS in Zellkulturmedium untersucht. Die Messung von Komplex 23 zeigt, dass bei einer getesteten Konzentration von 3 μM nach einer halben Stunde bereits 100 % der Substanz an FCS bindet. Die gebundene Menge ändert sich über 32 h nicht. Ref2 und Ref3 zeigen die gleiche Bindung. Da FCS ein Proteingemisch darstellt, ist eine so starke Interaktion durchaus möglich und für Goldverbindungen bereits beschrieben. [90, 114, 177–179]

Um unnötige Messungen zu vermeiden, werden weitere Versuche ausschließlich mit BSA in Zellkulturmedium durchgeführt. BSA ist ein Transportprotein des FCS und einer der Hauptvertreter im Blut. [177] Die Interaktion mit BSA allein ist deshalb interessant und wird auf den folgenden Seiten für ausgewählte Substanzen gezeigt. Um eine Vergleichbarkeit zu den Zellaufnahmestudien (siehe 5.4) zu schaffen, wird für diese Versuche eine Konzentration von 3 μM oder 5 μM gewählt und Proben bei 1, 2, 4, 8 und 24 h genommen. Während der Zellaufnahme können zu hohe Konzentrationen die Zellen abtöten, deshalb wird für diese Versuche ein Mittelweg zwischen den stark variierenden IC_{50} -Werten genutzt.

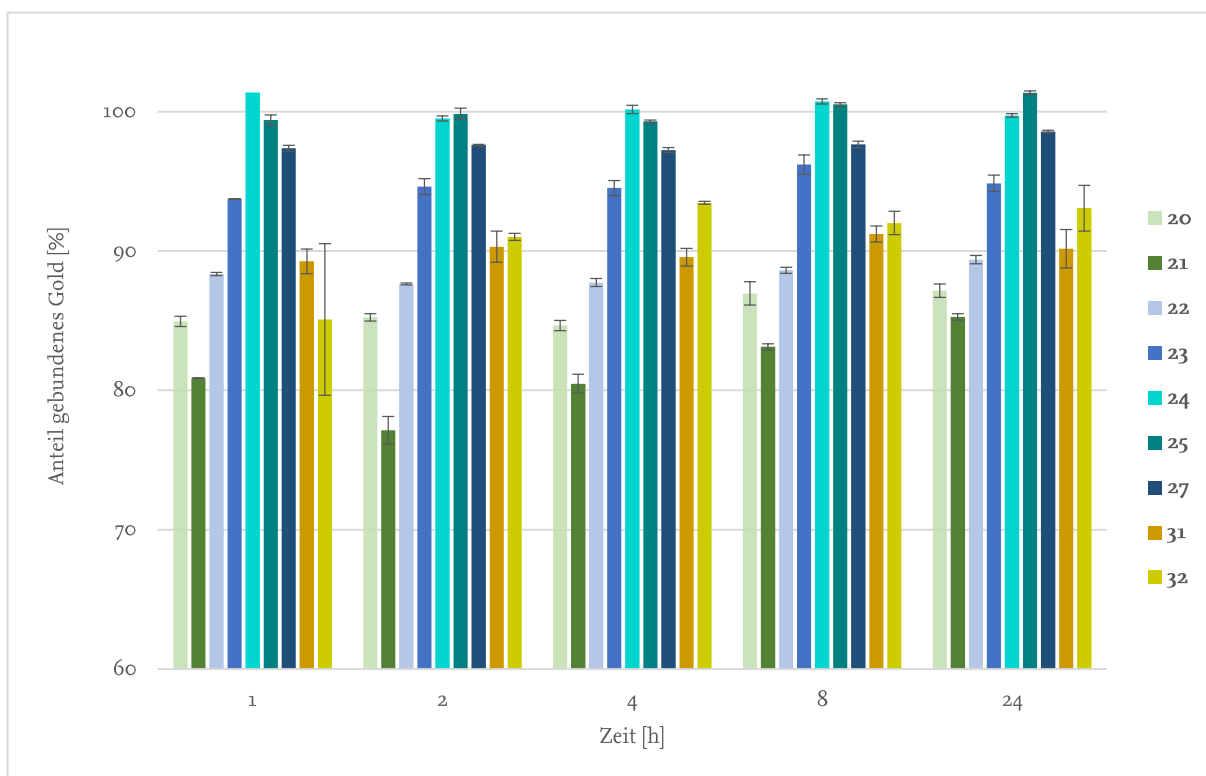


Abbildung 59 Bindung zu BSA bei einer Konzentration von 5 μM der Komplexe 20 - 25, 27, 31 und 32

Abbildung 59 zeigt die Bindung verschiedener NHC-Au(I)-Alkine zu BSA bei einer Inkubationskonzentration von 5 μ M. Es fällt direkt auf, dass die meisten Komplexe eine sehr hohe Bindung zu BSA zeigen. Mit einer nahezu 100-prozentigen Bindung an FCS und einer Bindung um 95 % wird an Komplex 23 als Beispiel deutlich, dass die NHC-Au(I)-Alkine hauptsächlich an BSA binden, aber ein kleiner Teil auch an die restlichen Bestandteile des FCS binden kann. Dies bedeutet, dass ein BSA-vermittelter Transport für die Substanzklasse möglich ist. Da die Bindung nach einer Stunde schon fast das Maximum erreicht, scheinen die Komplexe eine sehr hohe Affinität zu BSA zu haben und direkt damit zu interagieren. Innerhalb 24 h kann nur ein minimaler Anstieg beobachtet werden.

Die beiden Imidazol-Komplexe (20 und 21) zeigen die geringste Bindung. Die Komplexe mit unsubstituiertem Benzimidazol (22, 23 und 32) liegen um 90 %, wobei Komplex 23 davon am stärksten an das BSA bindet. Komplex 31 (FB-Ethyl-Au-FA) mit zwei Fluorresten erreicht vergleichbare Werte und die Komplexe 24 (MB-Methyl-Au-MA), 25 (MB-Ethyl-Au-MA) und 27 (FB-Ethyl-Au-MA) binden fast komplett an BSA.

Aus diesen Ergebnissen lassen sich mehrere Schlüsse ziehen. Die Bindungsrate korreliert in ihrer Tendenz mit den IC_{50} -Werten. Das bedeutet, dass die Komplexe mit hohen Aktivitäten auch eine hohe Affinität zu BSA haben. Die Komplexe scheinen also reversibel an BSA zu binden und das BSA könnte sogar eine Aufnahme in die Zelle begünstigen. Komplex 27 fällt aus dieser Beobachtung jedoch heraus. Der Komplex ist nicht aktiv, zeigt aber eine hohe BSA-Bindung. Es könnte sein, dass der Komplex eine zu hohe Affinität zu BSA besitzt und die Bindung sich dadurch nur schwer löst. Möglich ist auch, dass die BSA-Bindung keinen direkten Einfluss auf die Aktivität hat und die Korrelation zufällig ist. Die Zellaufnahmedaten können an dieser Stelle weitere Hinweise liefern.

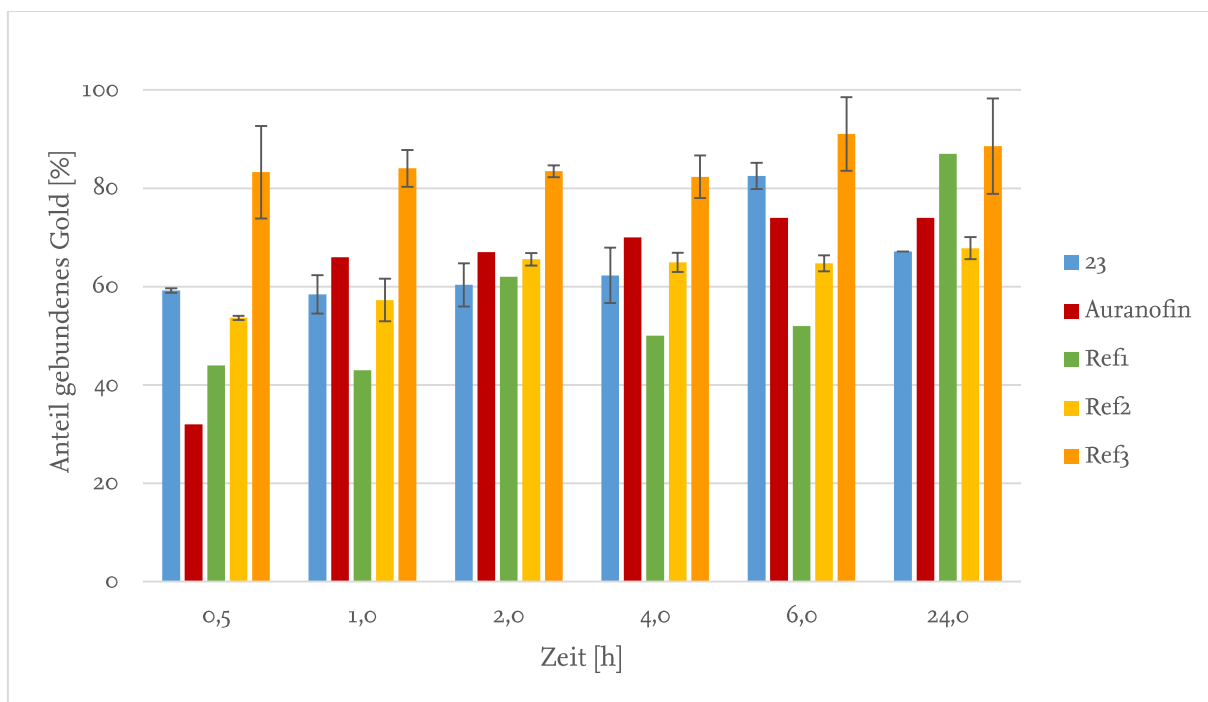


Abbildung 60 Bindung an BSA bei 3 μM von Komplex **23**, Auranofin [112], **Ref1** (HB-Ethyl-Au-TPP) [112], **Ref2** (TPP-Au-MA) und **Ref3** (TEP-Au-MA)

Abbildung 60 zeigt Komplex **23** im Vergleich zu den Referenzen. Die Inkubation hat bei diesem Versuch bei einer Konzentration von 3 μM stattgefunden. Man sieht im Konzentrationsvergleich mit dem vorherigen Versuch, dass Komplex **23** auch weniger an BSA bindet, die Bindung scheint damit zu einem gewissen Grad konzentrationsabhängig zu sein. Eine leichte Zunahme der Bindungsrate über die Zeit ist auch bei diesen Substanzen erkennbar, wobei diese bei Auranofin [112, 179] am stärksten ausgeprägt ist. Die drei Komplexklassen zeigen ähnliche Bindungsraten zu BSA. Für die NHC-Au(I)-Alkine ist dieser Vergleich positiv zu bewerten, da sie auf gleichem Niveau zu den Referenzen liegen. **Ref3** (TEP-Au-MA) zeigt im Vergleich zu allen anderen Testsubstanzen eine um 20 % höhere Bindung zu BSA. Diese bessere Affinität spiegelt sich aber nicht in einer auffallend besseren oder schlechteren antiproliferativen Aktivität wider. Die Bindung an BSA und die antiproliferativen Effekte scheinen zusammenfassend eine Korrelation zu zeigen, ob diese jedoch ebenfalls mit der Zellaufnahme zusammenpassen, wird im folgenden Kapitel dargestellt.

5.4 Zellaufnahmestudien

Die Wirkung der meisten Substanzen lässt sich über einen Mechanismus innerhalb der Zielzelle erklären. Die Frage nach der Menge an Wirkstoff in einer Zelle ist deshalb von großer Bedeutung und hilft, die Bioverteilung, Bioverfügbarkeit und später auch die Dosis einschätzen zu können. Wird eine inaktive Substanz überhaupt in die Zelle aufgenommen oder kann sie die Zellmembran gar nicht erst passieren, um ihren Wirkort zu erreichen? Falls eine hohe Zellaufnahme vorliegt, spiegelt sich diese ebenfalls in der Aktivität der Testsubstanz wider? Die Beantwortung dieser Fragen ist mit Hilfe von Zellaufnahmestudien möglich, die im Folgenden dargestellt werden.

Für die Untersuchung der Zellaufnahme der neu synthetisierten NHC-Au(I)-Alkine wird HT-29 als Testzelllinie ausgewählt. Die Zelllinie erweist sich bei verschiedenen Versuchen für die NHC-Au(I)-Alkine und Phosphan-Au(I)-Alkine als gut geeignet, deshalb wird sie der Vergleichbarkeit halber auch für diese Versuche genutzt (Vergleich Kapitel 5.2 und 5.6). Die Zellaufnahme wird zum einen zeitabhängig mit einer definierten Konzentration untersucht. Zum anderen werden einzelne Versuche auch in Bezug auf eine Konzentrationsabhängigkeit betrachtet. Um eine Vergleichbarkeit mit der Proteinbindung (Kapitel 5.3) zu ermöglichen, werden ebenfalls Konzentrationen von 1 μM , 3 μM oder 5 μM getestet. Für jeden Zeitpunkt einer Substanz sowie die unterschiedlichen Konzentrationen wird eine eigene Zellkulturflasche benötigt, wobei die untersuchten Zeitpunkte analog zu den Proteinbindungsuntersuchungen 1, 2, 4, 8 und 24 h betragen. Der genaue Ablauf des Versuchs ist in den Kapiteln 8.6.11, 8.6.12 und 8.6.14 erklärt. Um eine Vergleichbarkeit der Proben zu ermöglichen, wird der Proteingehalt mittels Bradford-Messung [180] bestimmt und der Goldgehalt pro mg Protein angegeben. Im Folgenden werden die verschiedenen Versuchsreihen dargestellt, die Ergebnisse erläutert und in Kapitel 7.1 zusammengefasst.

Abbildung 61 zeigt die zeitabhängige Aufnahme von Komplex 23 in HT-29-Zellen mit drei verschiedenen Konzentrationen. Es ist deutlich zu sehen, dass eine höhere Inkubationskonzentration zu höheren Goldgehalten in den Zielzellen führt, wobei sich die Aufnahme dabei aber nicht proportional zur Inkubationskonzentration verhält. Man kann somit nur die Aussage treffen, dass eine höhere Konzentration dazu führt, dass mehr Substanz in die Zelle gelangt. Mit 5 μM als höchste Konzentration ist ca. das Fünffache des IC_{50} -Wertes erreicht, sodass eine weitere Erhöhung kritisch für die Kultivierung sein könnte.

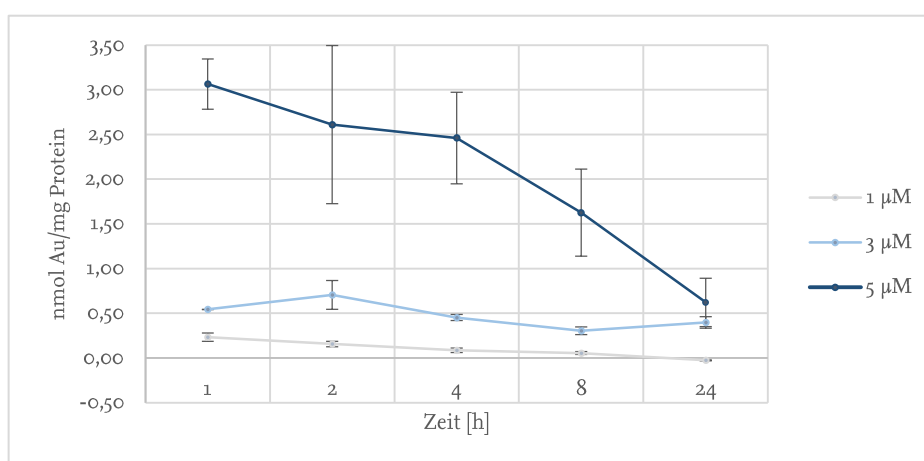


Abbildung 61 Goldgehalt in HT-29-Zellen von Komplex 23 bei 1 μM , 3 μM und 5 μM innerhalb von 24 h

Ob es eine Sättigungskonzentration gibt, kann bis 5 μM nicht bestimmt werden. Dass die Zellen eine so hohe Konzentration überhaupt überstehen, liegt in den unterschiedlichen Wachstumsphasen der Zellen während der jeweiligen Versuche. Der IC_{50} -Wert wird in der Wachstums- und Teilungsphase der Zellen bestimmt, die Zellaufnahme im Gegensatz dazu aber kurz vor Konfluenz, in der die Zellen robuster sind. Die Inkubationszeit ist während der Zellaufnahmeuntersuchungen zusätzlich deutlich kürzer als während der Versuche zu Antiproliferation und Zytotoxizität, sodass die Exposition für die Zellen reduziert ist.

Interessant ist bei diesem Versuch, dass nach 24 Stunden die aufgenommene Goldmenge stark absinkt und für alle drei Testkonzentrationen zwischen 0 und 0,75 nmol Au/mg Protein liegt. Die NHC-Au(I)-Alkine scheinen also schnell in die Zellen zu gelangen und dann mit der Zeit wieder ausgeschleust zu werden, wobei man nicht zwischen passivem und aktivem Transport oder Abbau unterscheiden kann.

Um den Einfluss von FCS während der Zellaufnahme zu betrachten, wird der Versuch einmal mit und einmal ohne das fetale Kälberserum durchgeführt. Da für die NHC-Au(I)-Alkine eine sehr hohe Bindung an FCS bzw. BSA gezeigt werden kann, stellt sich hier die Frage, ob diese Affinität einen Einfluss auf die Zellaufnahme hat.

Abbildung 62 und Abbildung 63 zeigen Komplex 23 mit 1 μM bzw. 5 μM Inkubationskonzentration, jeweils mit und ohne FCS.

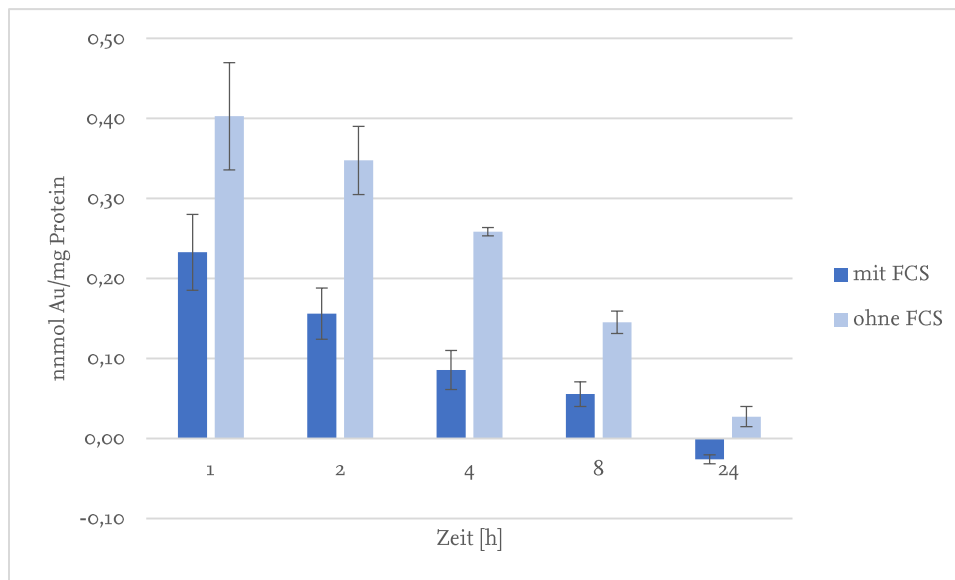


Abbildung 62 Goldgehalt von Komplex 23 (1 μM), zeitabhängig, mit und ohne FCS

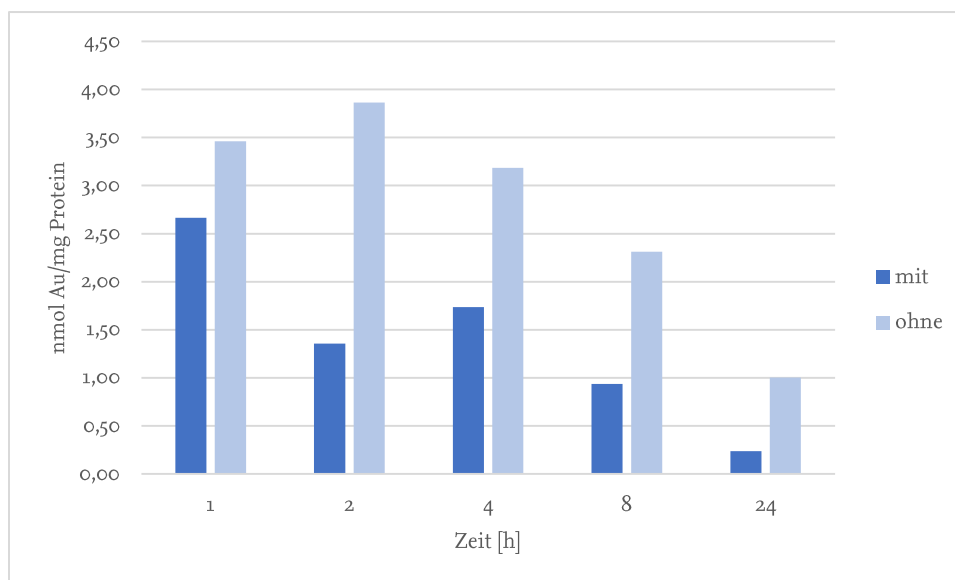


Abbildung 63 Goldgehalt von Komplex 23 (5 μM), zeitabhängig, mit und ohne FCS (nur eine Versuchsreihe)

Die schon erwähnten Konzentrationsunterschiede sowie die schnelle Aufnahme sind bei allen Durchgängen wiederzufinden. Genauso zeigen die Versuche, dass das Gold die Zelle mit der Zeit wieder verlässt. Auffällig ist die deutlich höhere Aufnahme von Gold in die Zellen ohne FCS.

Die Affinität zu dem Zellkultursupplement ist sehr hoch, vor allem das BSA bindet die NHC-Au(I)-Alkine sehr gut. Diese Bindung scheint bei Komplex **23** stark genug zu sein, um die Aufnahme in die Zelle zu reduzieren. Der Komplex bindet im Kulturmedium an die FCS-Proteine und löst sich anscheinend nicht ausreichend, um ungehindert in die Zellen aufgenommen zu werden. Eine BSA-vermittelte Aufnahme kann mit diesem Ergebnis ausgeschlossen werden, da diese mit FCS dann höher sein sollte. Eine starke Bindung an BSA und eine erhöhte Aufnahme in die Zelle ohne FCS-Beteiligung konnten im Arbeitskreis Ott für verschiedene Gold-Komplexe und Referenzen beobachtet werden. [116, 169]

Die Ergebnisse für Komplex **23** deuten auf eine konzentrationsabhängige und schnelle Zellaufnahme hin, die nach 24 h wieder stark abnimmt. Gleichzeitig scheint FCS den Komplex so stark zu binden, dass die Aufnahme reduziert wird.

Ob die anderen NHC-Au(I)-Alkine sich ebenfalls so verhalten, zeigt Abbildung 64. Für die Komplexe der ersten Serien (ausgenommen Komplex **26**) wird darin die zeitabhängige Aufnahme mit FCS bei einer Inkubationskonzentration von 5 μ M gezeigt.

Man kann für die gesamte Serie eine hohe Aufnahme innerhalb der ersten Stunde erkennen und eine zeitabhängige Reduktion des Goldgehalts in den Zellen nach 24 Stunden. Komplex **24** zeigt eine extrem große Aufnahme und geringes Ausschleusen, jedoch weisen die Ergebnisse für diesen Komplex auch eine recht hohe Streuung auf.

Die Zellaufnahmeergebnisse passen in der Tendenz gut zu den Aktivitäten des Zytotoxizitätstests. Die ethylierten Komplexe (**21**, **23**, **25** und **27**) sind etwas aktiver als ihre methylierten Partner (**20**, **22**, **24**, **26**), genauso verhält sich die Zellaufnahme. Die Komplexe **23** (HB-Ethyl-Au-MA), **24** (MB-Methyl-Au-MA) und **25** (MB-Ethyl-Au-MA) sind die aktivsten der Serien und haben auch die höchste Zellaufnahme.

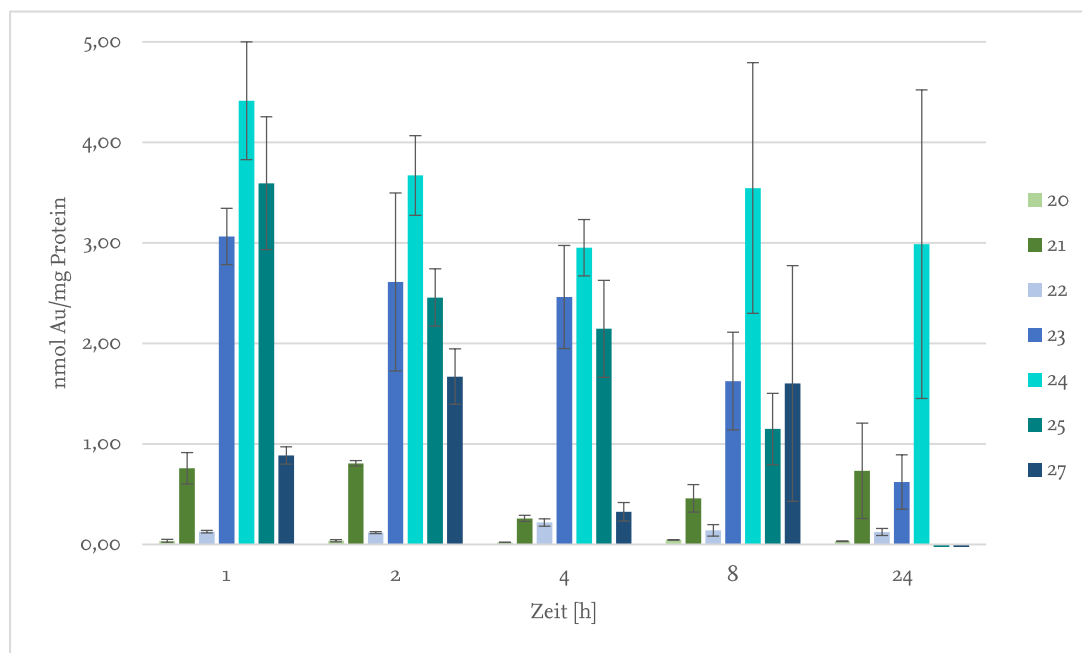


Abbildung 64 Goldgehalt in HT-29-Zellen verschiedener NHC-Au(I)-Alkine bei 5 μ M mit FCS innerhalb von 24 h

Wie in Kapitel 5.3 beschrieben, ist eine gewisse Korrelation zwischen Proteininteraktion und Zytotoxizität zu erkennen. Diese Korrelation ist in den Aufnahmestudien sogar noch deutlicher wiederzufinden. Die aktivsten Komplexe der ersten Serie (23, 24 und 25) binden am stärksten an BSA und haben die höchste Zellaufnahme. Die Ergebnisse für Komplex 23 mit und ohne FCS deuten jedoch auf eine reduzierte Aufnahme mit FCS hin, folglich sollte eine gute BSA-Bindung zu einer kleineren Zellaufnahme führen. Dies ist jedoch nicht der Fall, was verschiedene Ursachen haben kann.

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die Bindung an BSA bzw. FCS zufällig mit der Zellaufnahme und Zytotoxizität korreliert. Der Effekt der verringerten Aufnahme wurde zudem nur für Komplex 23 untersucht; er könnte bei den anderen Komplexen anders ausfallen. BSA als isoliertes Protein kann sich im Vergleich zum komplexen FCS ebenfalls anders verhalten.

Die Reduzierung der Zellaufnahme mit FCS könnte im Zytotoxizitätstest je nach verwendeter Konzentration auch so gering sein, dass der Effekt keine relevanten Änderungen hervorruft.

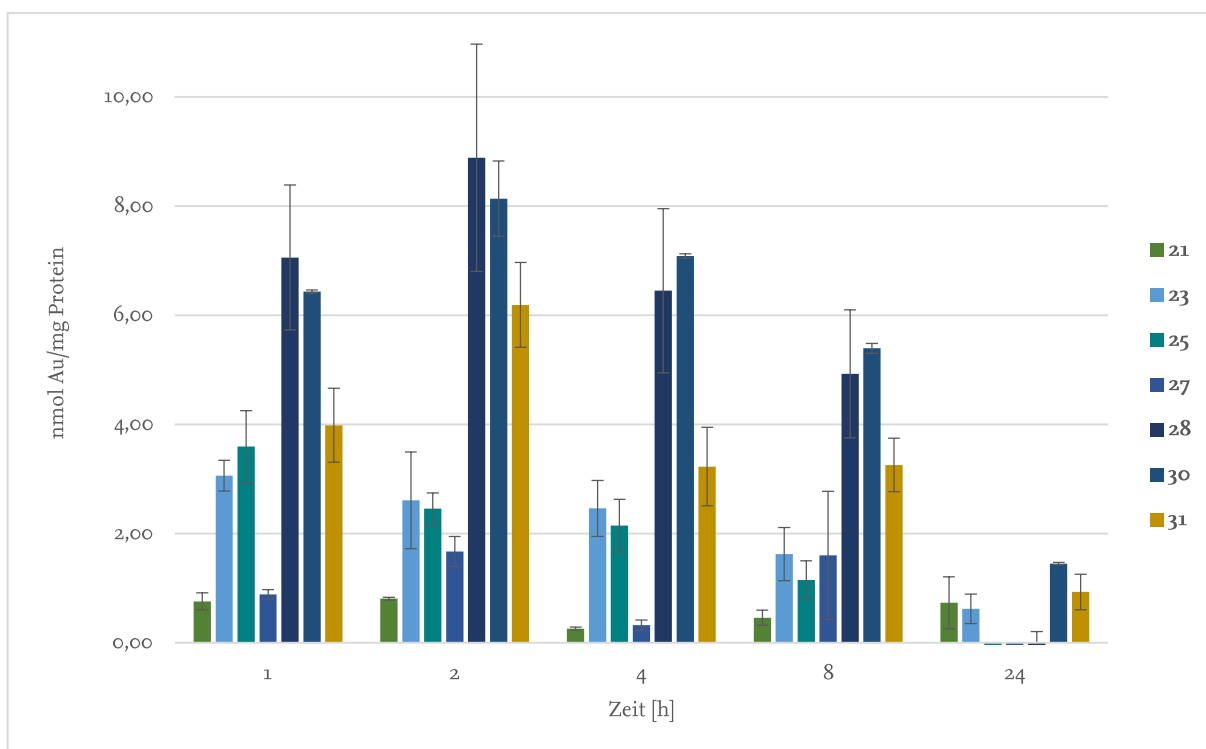


Abbildung 65 Goldgehalt in HT-29-Zellen verschiedener ethylierter NHC-Au(I)-Alkine bei 5 µM mit FCS innerhalb von 24 h; Komplexe 28, 30 und 31 enthalten Fluorreste

Serie 2 der NHC-Au(I)-Alkine enthält Fluorreste, die hauptsächlich zur Untersuchung der Zellaufnahme und möglicher Dissoziationsverhältnisse eingeführt wurden. Die Serie sollte helfen zu verstehen, ob die Komplexe im Ganzen in die Zellen gelangen oder ein Ligand evtl. abgespalten wird. Dazu können die normalen Zellaufnahmeprobe jeweils auf den Gold- und den Fluorgehalt geprüft werden.

Abbildung 65 zeigt die Goldgehalte für die ethylierten Komplexe aus Serie 1 (21, 23, 25, 27) und drei Komplexe der Serie 2 (28, 30, 31), die Strukturen sind nochmal in Abbildung 66 gezeigt.

Es fällt auf, dass die drei Komplexe mit Fluorrest eine höhere Zellaufnahme aufweisen als die Komplexe der Serie 1. Fluor als relativ kleiner gleichzeitig aber elektronenreicher Rest hat großen Einfluss auf die Lipophilie und somit auch auf die Zellaufnahme von Substanzen. [181, 182] Das Einführen eines Fluorrestes führt für die NHC-Au(I)-Alkine zu einer besseren Aufnahme, wobei irrelevant ist, ob der Rest am NHC- oder Alkinteil angebracht wird. Komplex 31 mit je einem Fluorrest an NHC und Alkin zeigt jedoch keine weitere Verbesserung der Aufnahme, der Komplex erreicht nicht einmal die Goldgehalte der monofluorierten Komplexe (28 und 30).

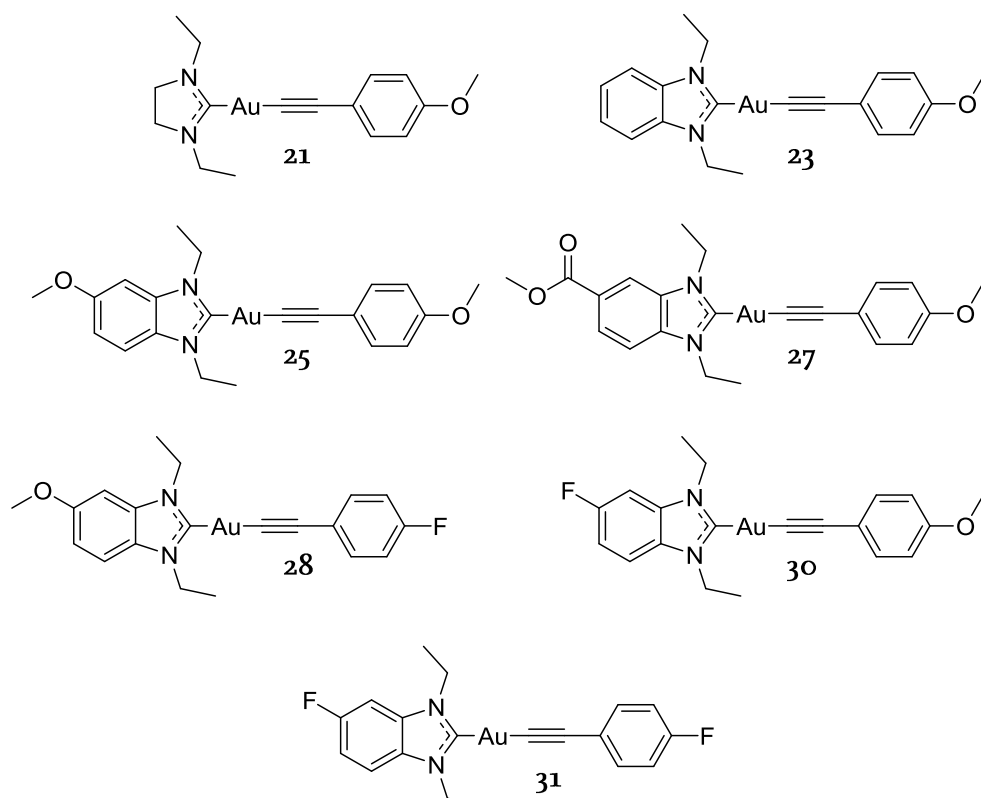


Abbildung 66 In Abbildung 65 auf ihre Zellaufnahme verglichenen Komplexe 21, 23, 25, 27, 28, 30 und 31

Für die zweite Serie lässt sich keine gute Korrelation zwischen Zellaufnahme und Zytotoxizität erkennen. Komplex **28** und **31** zeigen keine höhere Aktivität, haben aber beide eine sehr hohe Zellaufnahme. Komplex **30** ist mit einer sehr hohen Zellaufnahme wiederum einer der aktivsten Komplexe innerhalb dieser Arbeit.

Die Fluorreste scheinen somit zwar die Zellaufnahme zu erhöhen, führen aber nicht unbedingt zu einer Aktivitätssteigerung. Dies deutet darauf hin, dass die Zellaufnahme für die Komplexe nicht der einzige aktivitätsbeeinflussende Faktor ist. Die Komplexe müssen in der Zelle erst noch zu ihren Zielstrukturen gelangen und damit auch interagieren.

Die Erkenntnis, dass Fluorreste die Zellaufnahme erhöhen, ist für Strukturwirkungsbeziehungen interessant. Serie 2 soll aber auch die Frage beleuchten, ob die NHC-Au(I)-Alkine als gesamter Komplex in die Zelle gelangen oder ob eine Dissoziation stattfindet. Die von Dr. Claudia Schmidt eingeführte Messmethode (Kapitel 8.6.14) der Molekülabsorptionsspektrometrie für Fluor kann dabei zusätzlich zur Goldbestimmung herangezogen werden. [114, 118, 183]

Während der Messungen stellt sich jedoch heraus, dass die NHC-Au(I)-Alkine auf diese Weise nicht vermessen werden können. Die NHC-Au(I)-Alkine scheinen während der Atomisierung

Fluor nicht ausreichend an das zur Molekülbildung genutzte Galliumnitrat abzugeben, wodurch kein messbares Galliummonofluorid (GaF) entsteht. Dies ist für eine Signalerfassung aber essentiell. [117–119, 184, 185] Die Kalibrierungslösungen sowie die Proben der Zellaufnahme zeigen keine auswertbaren Signale, während eine Probe mit Natriumfluorid als Kontrolldurchlauf ein deutliches Signal aufweist. Quenchingeffekte oder Matrixeinfluss kann durch den Kontrolllauf ebenfalls ausgeschlossen werden.

Die gleichen Proben wurden für die Goldbestimmung genutzt, bei der problemlos Gold im nanomolaren Bereich detektiert werden kann. Da auch für die Kalibrierlösung keine Signale messbar sind, ist auch eine komplette Dissoziation der NHC-Au(I)-Alkine und Ausschleusung der fluorierten Liganden unwahrscheinlich. Die Frage, ob die NHC-Au(I)-Alkine als Gesamtkomplex oder nur mit einem der Liganden in die Zelle aufgenommen werden, kann somit mit dieser Methode nicht beantwortet werden.

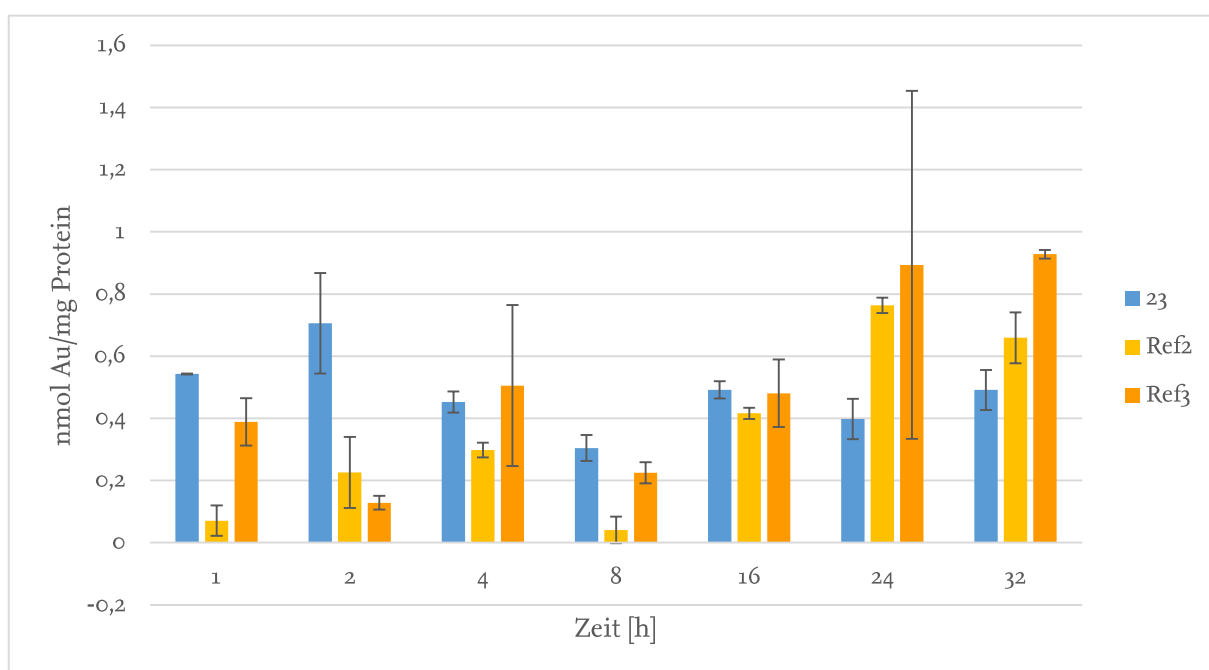


Abbildung 67 Goldgehalte für Komplex 23, Ref2 und Ref3 bei $3 \mu\text{M}$ innerhalb von 32 h

Abschließend wird Komplex 23 als $\text{NHC-Au(I)-Alkin-Vertreter}$ mit den beiden Phosphanreferenzen verglichen. Abbildung 67 zeigt die Goldgehalte nach Inkubation mit $3 \mu\text{M}$ der Testsubstanz. Die Konzentration entspricht der Inkubationskonzentration der Bindungsversuche an BSA. Anders als die NHC-Au(I)-Alkine zeigen die Phosphane eine Akkumulation über die Zeit in den Zellen. Beide Substanzklassen binden ähnlich an BSA, verhalten sich aber bei der Zellaufnahme anders, was auf einen anderen Aufnahmeweg hindeutet oder in unterschiedlichen Löslichkeitseigenschaften und Affinitäten begründet liegen kann.

Betrachtet man die aufgenommene Goldmenge, erreichen die NHC-Au(I)-Alkine mit Goldgehalten im einstelligen nanomolaren Bereich ähnliche Werte wie andere Organometallkomplexe. [68, 169]

Zusammenfassend kann man aus den Ergebnissen folgern, dass die NHC-Au(I)-Alkine mit hoher Zellaufnahme auch die besten antiproliferativen Effekte zeigen. Da aber auch die inaktiven Komplexe in die Zellen gelangen, scheinen diese Verbindungen innerhalb der Zelle nicht an ihre Zielstrukturen zu gelangen, können nicht ausreichend mit ihnen interagieren und sie inhibieren oder sie unterliegen Zersetzungsreaktionen.

5.5 TrxR-Inhibition

Wie bereits in Kapitel 1.3 beschrieben, interagiert Gold(I) sehr gut mit selen- und schwefelhaltigen Strukturen, zu denen die humane Thioredoxinreduktase (TrxR) zählt. Thioredoxinreduktasen kommen ubiquitär in verschiedenen Spezies vor. Säugetiere weisen drei Varianten auf: die zytosolische TrxR1, eine mitochondriale TrxR2 und eine gewebespezifische TrxR3. [186–188] Alle Varianten bestehen aus Homodimeren, also aus zwei gleichen Monomeren. Die Monomere besitzen je ein Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) als prosthetische Gruppe und eine NADPH-Coenzymbindestelle, des Weiteren zeigen die Monomere zwei konservierte Redoxzentren. Eines davon ähnelt der Gluthationreduktase und das andere enthält Cystein und Selenocystein. [189–197] Selenocystein stellt eine Seltenheit dar und steigert die Aktivität der Goldkomplexe im Vergleich zu Cystein haltigen Strukturen deutlich. Gleichzeitig ist dieser Enzymbereich durch die gute Affinität zu Gold(I) als Target für Goldkomplexe von großer Bedeutung. [198–200] Die spezifische Interaktion und die Seltenheit des Selenocysteins sind nicht die einzigen Gründe, warum die TrxR als Target für Zytostatika interessant ist.

Die TrxR und ihr Substrat Thioredoxin (Trx) sind an der Aufrechterhaltung der Redoxhomöostase der Zelle beteiligt, sie schützen Zellen vor ROS und haben Einfluss auf DNS-Synthese sowie Transkription. [194, 201, 202] Das Trx ist an der Bindungsregulierung verschiedener Transkriptionsfaktoren an der DNS beteiligt, wozu auch p53 zählt. [203] Dieses Protein reguliert bei Schädigungen der DNS die Apoptose, wobei bei vielen Krebsarten Punktmutationen in der p53-Codierung gefunden werden, wodurch die Apoptoseeinleitung gestört ist. [85, 204] Zudem ist Trx ein Cofaktor für die Ribonukleotidreduktase, die

Desoxyribonukleotide herstellt und somit direkt an der DNS-Synthese beteiligt ist. [205] Es ist bekannt, dass die TrxR in Krebszellen überexprimiert wird und mit einer hohen TrxR-Konzentration die Chemoresistenz steigt. [206–210] Die Menge an Trx ist ebenfalls ein Indikator für den Schweregrad der Krebserkrankung. [211, 212]

Frühere Arbeiten zeigten, dass organometallische Goldkomplexe mit dem Enzym interagieren und dessen Aktivität reduzieren können. [51, 70, 93, 113, 213–215] Da die TrxR, wie beschrieben, in Krebszellen überexprimiert ist und Goldverbindungen einen inhibierenden Effekt auf das Enzym zeigen, ist dieses ein gutes Target, um Krebszellen selektiv anzugreifen. Wird das Enzym blockiert, kann der hohe Bedarf an reduziertem Trx nicht mehr ausreichend abgedeckt werden und die Zellen gelangen durch den erhöhten Stoffwechsel und die vielen Abbauprodukte in einen lebensunfähigen Zustand. [189, 216–218] Die TrxR₁ ist käuflich erwerbbar und somit sind in vitro Untersuchungen der inhibitorischen Fähigkeiten der Komplexe möglich. [219] Für die Versuche wird eine murine TrxR genutzt, die aus Rattenleber gewonnen wird. [189, 218, 220] Die Ähnlichkeit der TrxR zwischen Mensch und Ratte ist ausreichend, um klassenübergreifend Schlüsse ziehen zu können.

Für die Versuche werden die zu testenden Komplexe in geeignetem Lösemittel gelöst und mit passendem Puffer Verdünnungsreihen hergestellt. Interagieren die Komplexe mit der TrxR und inhibieren ihre Aktivität, ist dies durch die Veränderung der Substratverarbeitung messbar. Die TrxR wird bei dem Versuch mit einer Verdünnungsreihe der Testsubstanz als Inhibitor inkubiert und dann der Umsatz von 5,5'-Dithiobis-2-dinitrobenzoesäure (DTNB) zu 2-Thio-5-nitrobenzoesäure (TNB) durch die TrxR gemessen. Ist das Enzym blockiert, ist eine geringere Färbung sichtbar, da DTNB nicht gespalten wird. Findet wiederum keine Inhibition des Enzyms statt, kann DTNB zu TNB umgesetzt werden und die Testlösung zeigt eine starke Gelbfärbung (siehe Abbildung 68).

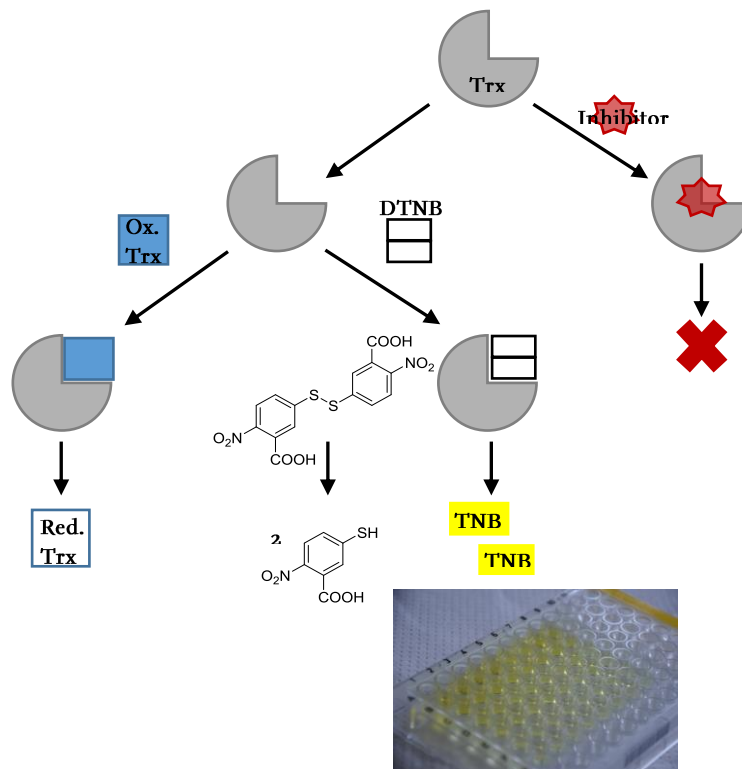


Abbildung 68 oben: Schematische Darstellung der Umsetzung von Trx bzw. DTNB zu TNB durch TrxR und Inhibition des Enzyms; unten: 96-Loch-Platte mit TNB-Färbung

Wie bereits erwähnt, ist das natürliche Substrat der TrxR das Trx, dessen Disulfidgruppe in Anwesenheit von NADPH durch die TrxR reduziert und gespalten wird. [221] Um die Auswertung des Versuchs photometrisch durchführen zu können, wird als Substratersatz DTNB verwendet. DTNB besitzt ebenfalls eine Disulfidgruppe und ist im gespaltenen Zustand als TNB gelb gefärbt. Die Farbveränderung kann im Bereich 405 nm und 412 nm gemessen werden, wobei sichergestellt sein muss, dass die Testsubstanzen im gemessenen Bereich keine Eigenabsorption besitzen. [222]

Das Versuchsprotokoll für die Inhibitionstests an der TrxR ist im Arbeitskreis etabliert, jedoch treten Schwankungen der Aktivität der TrxR während der Versuche auf. Die Linearität sowie Steigung und somit die Aktivität unterliegen für die ungehemmte Säugetier-TrxR einer großen Streuung. [223] Dies hat mehrere Gründe, zum einen ist die Aktivität der TrxR-Chargen oft sehr unterschiedlich. Die Raumtemperatur während der Probenvorbereitung hat ebenfalls Einfluss auf das Enzymverhalten und die Probenvorbereitung selbst ist komplex und stark von der Erfahrung des Durchführenden abhängig.

Die TrxR-Qualität wird zwischen den Chargen angeglichen, indem die Proben nicht auf Einheiten eingestellt werden, sondern die Aktivität in einem Vorversuch gemessen wird und die

Versuche mit einer ausreichenden Aktivität durchgeführt werden. Diese liegt für die meisten Chargen zwischen 3 und 5 Units pro ml.

Durch Änderung des Puffersystems, Substratzugabe und Temperierung des Reaktionsmix können die Schwankungen reduziert werden. [224] Das Puffersystem aus der, für die bakterielle E. coli-TrxR genutzten, Methode zeigt keine Verbesserung der Linearität. [114] Genauso verhält es sich mit der zusätzlichen Zugabe von Trx, eine einheitliche Aktivierung durch das natürliche Substrat kann nicht beobachtet werden. Das Enzym hat sein Temperaturoptimum eher bei Körpertemperatur, wird mit dem Reaktionsmix ein großes Volumen zu den Testproben gegeben, sinkt die Proben temperatur drastisch. Wird der Assay also im Extremfall einmal im Sommer und einmal im Winter durchgeführt, kann dies deutliche Unterschiede in den Ergebnissen hervorrufen, da das Enzym eine temperaturabhängige Aktivität zeigt. [225, 226] Der Reaktionsmix wird deshalb testweise auf 37 °C erwärmt, bevor die Aktivitätsmessung durchgeführt wird. Findet eine Anpassung des Reaktionsmix auf die Inkubations- und Testtemperatur von 37 °C statt, zeigt die Aktivität der freien TrxR eine minimierte Streuung und die Wiederholungszahl der Versuche kann reduziert werden. Das stellt eine deutliche Kostenersparnis dar, da das benötigte NADPH und das Enzym selbst sehr teuer sind.

Die erste NHC-Au(I)-Alkin-Serie wird auf eine mögliche Enzyminhibition getestet. Die Ergebnisse sind wie beim Zytotoxizitätstest als IC₅₀-Wert in Abhängigkeit zu einer Positivkontrolle in Tabelle 21 dargestellt. Die getesteten Substanzen inhibieren die Aktivität der murinen TrxR im nanomolaren Bereich.

Komplexe 24, 25 und 27 erreichen IC₅₀-Werte im dreistelligen nanomolaren Bereich, während Komplexe 20, 22 und 23 ca. 10-fach aktiver sind.

Ähnlich den IC₅₀-Werten muss beim Vergleich der Ergebnisse eher von Bereichen gesprochen werden. Die Ergebnisse liegen im nanomolaren Bereich, wobei man mit den Verdünnungsschritten und dem damit einhergehenden Pipettenfehler einen gewissen Präzisionsverlust beachten muss, worauf in Kapitel 7.1 näher eingegangen wird.

Komplex	Kurzname	IC ₅₀ -Wert [nM]
20	Im-Methyl-Au-MA	49 ^{±17}
21	Im-Ethyl-Au-MA	n.b.
22	HB-Methyl-Au-MA	61 ^{±37}
23	HB-Ethyl-Au-MA	54 ^{±10}
24	MB-Methyl-Au-MA	204 ^{±156}
25	MB-Ethyl-Au-MA	499 ^{±80}
26	EB-Methyl-Au-MA	n.b.
27	EB-Ethyl-Au-MA	405 ^{±99}
AuCl	-	128 ^{±34} [169]
14	HB-Au-Cl	361 ^{±40} [116]
Ref1	HB-Au-TPP	66 ^{±2} [116]
TEP-Au-Cl	TEP-Au-Cl	33 ^{±5} [169]
Ref3	TEP-Au-MA	60 ^{±10} [51]
Auranofin	-	93 ^{±9} [169]

Tabelle 21 IC₅₀-Werte [nM] für TrxR der Komplexe 20 - 27 und Referenzen

Die unsubstituierten Komplexe mit Imidazol (**20**) und Benzimidazol (**22** und **23**) zeigen eine stärkere Inhibition des Enzyms als die Komplexe, die an 5-Position der NHCs substituiert sind (**24**, **25** und **27**). Dies könnte darauf hindeuten, dass die Komplexe ab einer gewissen Länge bzw. ab einem gewissen Molekylvolumen an Aktivität verlieren. Gleichzeitig ist zwischen der NHC-Au(I)-Cl-Vorstufe (**14**) und dem NHC-Au(I)-Alkin (**23**) eine Aktivitätssteigerung sichtbar. Die Komplexierung mit Alkinliganden ist also ohne Aktivitätsverlust möglich, jedoch scheint, wie bereits erwähnt, die Aktivität stark von dem Molekylvolumen bzw. den Ligandeneigenschaften abhängig zu sein. Die Bindetasche der TrxR ist zwar relativ frei zugänglich, da sie außen am Enzym liegt, bietet dennoch nur begrenzt Platz, sodass hier eine mögliche Erklärung für die geringe Aktivität der langen NHC-Au(I)-Alkine liegen könnte. [227, 228]

Dass die Komplexe bei der Inhibition nicht oder nur teilweise dissoziieren, wird deutlich, wenn man die Ergebnisse für AuCl allein betrachtet. Würden alle Komplexe nur als Transportmittel für das Gold(I) fungieren, würden Werte um 128 nM gemessen werden, wie es bei dem AuCl der Fall ist. Die verschiedenen Komplexe und Referenzen zeigen aber deutlich davon abweichende IC₅₀-Werte, sodass davon ausgegangen werden kann, dass der Komplex zur Interaktion mit der TrxR nicht komplett dissoziiert oder die Stabilisierung durch die Liganden bis zu einem gewissen Zeitpunkt essentiell ist. Gold(I)-Salze reagieren in wässrigem Milieu spontan zu Gold(0), das inaktiv ist, und zu Gold(III). Stabile Liganden schützen das Gold(I)-Zentralatom also vor Nebenreaktionen.

Die IC₅₀-Werte der kleinen NHC-Au(I)-Alkine liegen im gleichen Bereich wie die der bekannten Klassen und Auranofin, die längeren NHC-Au(I)-Alkine können diese Aktivität nicht erreichen. Vergleicht man nun die Ergebnisse der ersten NHC-Au(I)-Alkinserie für die Zytotoxizitätsuntersuchungen und die IC₅₀-Werte der Enzyminhibitionsversuche, lässt sich keine Korrelation erkennen. Die aktivsten TrxR-Inhibitoren (20, 22 und 23) in vitro sind nicht die aktivsten Substanzen, wenn es um die Wachstumshemmung der Krebszellen geht (23, 24 und 25). Komplex 23 ist hierbei die Ausnahme, da die Substanz in beiden Testreihen gute inhibitorische Effekte aufweist. Die mangelnde Korrelation zwischen Enzyminhibition und antiproliferativen Effekten deutet darauf hin, dass die TrxR nicht das einzige Target der NHC-Au(I)-Alkine sein kann bzw. die Komplexe je nach Liganden anders von den Zellen aufgenommen oder sogar verstoffwechselt werden. Es ist bekannt, dass die Liganden eines Goldkomplexes und seine Ladung den Wirkort und die Targets beeinflussen. Die zytosolische TrxR und die Mitochondrien sind hierbei zwei viel besprochene Zielstrukturen. [219]

5.6 Untersuchungen am Zelllysat

Da die antiproliferativen Effekte und die Aktivitätsinhibition der isolierten TrxR nicht direkt korrelieren, stellt sich die Frage, ob die Komplexe überhaupt einen Einfluss auf die TrxR in der Zelle haben. Erste Untersuchungen über einen immunologischen Nachweis der zytosolischen TrxR₁ aus HT-29-Zellen mittels Western Blot sollen zeigen, ob ein sichtbarer Einfluss auf die Enzymmenge vorliegt. [229]

Die NHC-Au(I)-Alkine sind ungeladen, eine Wirkung im Zytosol ist deshalb wahrscheinlicher als in den Mitochondrien, sodass die TrxR₁ als Zielstruktur gewählt wird. Hierzu werden HT-29-Zellen mit einem Komplex inkubiert, die Zellen mechanisch aufgebrochen, um einen Aktivitätsverlust durch Lysierung zu verhindern und mittels immunologischer Detektion die TrxR₁ nachgewiesen (siehe Kapitel 8.6.16, 8.6.17 und 8.6.18). Verändern die Komplexe die Expression der TrxR oder führt die Inhibition zum Enzymabbau, kann dies semiquantitativ mittels Western Blot nachgewiesen werden. Dazu wird das Zytosol der behandelten HT-29-Zellen von Membranresten getrennt und mittels Bradford die Proteinmenge der Probelösungen vereinheitlicht. Die Probelösungen werden mittels Gelelektrophorese anhand ihrer Proteingröße aufgetrennt und mittels Westernblot auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Proteinbanden werden mit TrxR₁-Antikörper behandelt und es wird ein Sekundärantikörper

verwendet, um die signifikanten TrxR-Banden sichtbar zu machen. Zum Vergleich werden unbehandelte Zellen herangezogen und die entstandenen Banden der TrxR bezüglich ihrer Dicke und Intensität verglichen.

In Abbildung 69 ist links der antikörperbehandelte Blot zu sehen und rechts das dazugehörige SDS-Gel, an dem die gleichmäßige Beladung mit Protein zu erkennen ist.

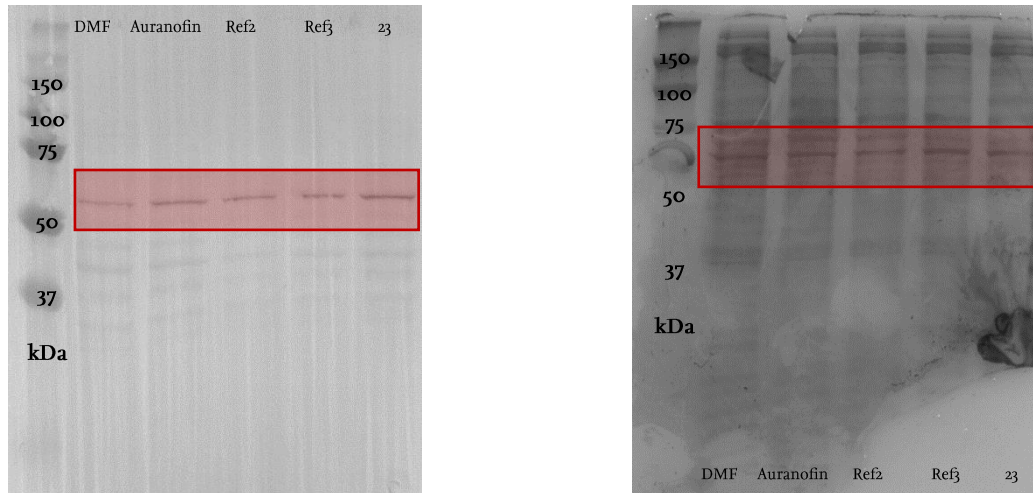


Abbildung 69 Beladung: von links nach rechts: Protein-Leiter, DMF-Kontrolle, Auranofin, Ref2, Ref3 und Komplex 23; links: Blot auf PVDF-Membran behandelt mit Maus α -TrxR₁ (hum.) als Primärantikörper und HRP-gekoppeltem Ziege α -Maus Sekundärantikörper, detektiert mit TMB, rechts: SDS-Page detektiert mit Coomassie

Das Gelbild zeigt eine einheitliche Proteinbeladung, sodass die Banden des Blots gut miteinander verglichen werden können. Die TrxR₁-Bande der DMF-Kontrolle scheint minimal dünner als die der TrxR-Inhibitoren zu sein, was durch den mangelnden xenobiotischen Stress der Kontrolle erklärt werden kann. Die Zellen müssen ihren Stoffwechsel an die Stresssituation anpassen und die TrxR-Menge nimmt zu. Komplex 23 zeigt die breiteste Bande. Laut der IC₅₀-Werte sollten die getesteten Substanzen einen ähnlichen Effekt auf die TrxR zeigen. Diese Ergebnisse sind durch ihren semiquantitativen Charakter jedoch allein nicht aussagekräftig. Die Enzymmenge sagt nämlich in diesem Versuch nichts über die Aktivität des Enzyms aus. Obwohl die TrxR₁-Bande für Komplex 23 etwas breiter erscheint, kann es sein, dass das Enzym überhaupt nicht mehr aktiv ist.

Da die immunologischen Untersuchungen auf keine quantitative Veränderung der Enzymmenge hindeuten, wird die Aktivität des Enzyms im Zellsystem bestimmt. Das bedeutet, dass die Krebszellen mit den Testsubstanzen behandelt werden und mittels Aktivitätstest die Restaktivität der extrahierten TrxR bestimmt wird. Dies gibt weitere Hinweise auf den Einfluss

der Komplexe auf die TrxR und kann die in vitro gewonnenen Ergebnisse ergänzen. Ein Enzymaktivitätstest angepasst an das Zelllysate wurde an dieser Stelle im Arbeitskreis etabliert und durchgeführt, sodass man die Aktivität von disulfidspaltenden Enzymen untersuchen kann. Der Versuch basiert auf dem TrxR-Inhibitionsassay, wobei Testlösung und Enzym aus dem Zelllysate stammen und die Versuche auf die Proteinmenge mittels Bradford-Proteinbestimmung eingestellt werden (siehe Kapitel 8.6.18 und 8.6.19). Die Komplexe unterliegen bei diesem Versuch zuerst den gleichen Bedingungen wie bei den Zellaufnahmeuntersuchungen. Die Zellen werden jedoch nach einer definierten Zeit gekühlt und mechanisch aufgebrochen, um das aktive Zellinnere für die weitere Untersuchung zu gewinnen. Das so gewonnene Zelllysate besitzt funktionierende Enzyme, die untersucht werden können. Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wird das Zelllysate auf eine definierte Menge Protein eingestellt und der Enzymaktivitätsassay damit durchgeführt. Als Referenz bzw. als 100 %-Vergleich dienen Zellen, die mit DMF unter gleichen Bedingungen inkubiert werden.

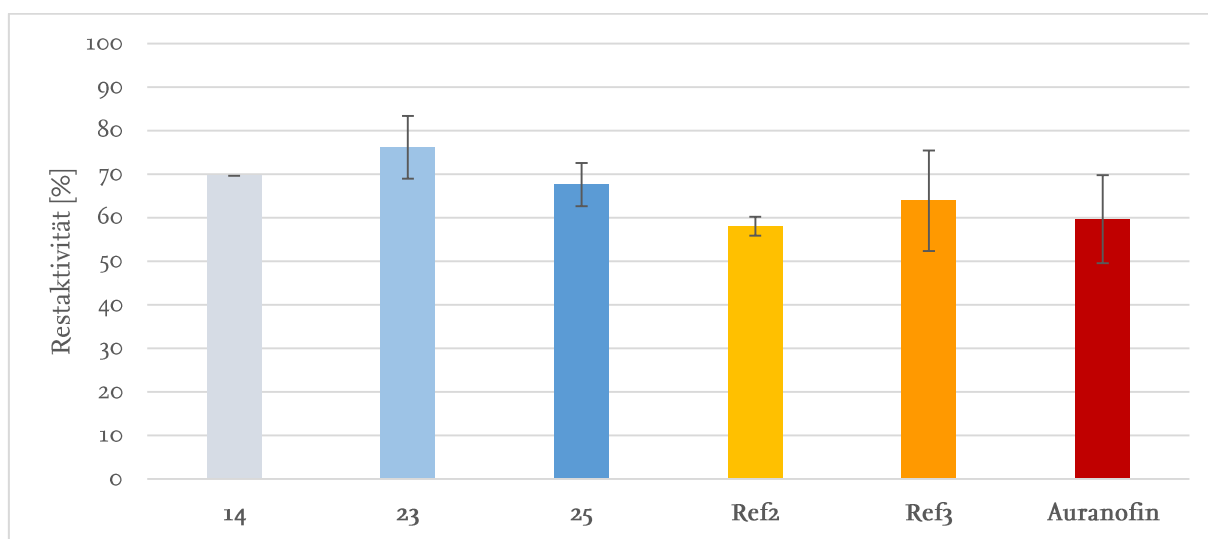


Abbildung 70 Restaktivität [%] der disulfidspaltenden Enzyme verschiedener Gold(I)-Verbindungen

Abbildung 70 zeigt die Restaktivität in Prozent, bezogen auf die DMF-Kontrolle. Dieser angepasste Test ist nicht selektiv für die TrxR, da auch andere Enzyme aus dem Zellinneren DTNB spalten können. Es wird also die Restaktivität aller disulfidspaltenden Enzyme getestet, was für eine Einschätzung der Stoffwechselaktivität und Zielstrukturfindung hilfreich ist. Für alle getesteten Substanzen lässt sich somit eine Hemmung der disulfidspaltenden Enzyme erkennen. Die NHC-Au(I)-Alkine (23 und 25) erreichen genau wie die NHC-Au(I)-Cl-Vorstufe (14)

Restaktivitäten um 70 %. Auranofin und die beiden Phosphan-Au(I)-Alkine (**Ref2** und **Ref3**) zeigen Restaktivität bei ca. 60 %.

Ob nur die TrxR inhibiert wird, ist anhand dieser Versuchsanordnung nicht ermittelbar, aber der Einfluss auf den Enzymhaushalt der HT-29-Zellen ist deutlich erkennbar. Passend zu den in vitro Ergebnissen der TrxR-Inhibition in Kombination mit den antiproliferativen Effekten deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die TrxR möglicherweise nicht das einzige Target der Gold(I)-Verbindungen ist. Gleichzeitig wird bestätigt, dass die Stoffwechsel- bzw. Enzymaktivität der Zellen reduziert wird.

6 Phosphan-Au(I)-Alkine: Formulierungsversuche und Vergleich des zytotoxischen Potentials

Viele neu entwickelte Substanzen sind große und komplexe Moleküle, die stark lipophile Eigenschaften aufweisen. Für die Synthese sind solche Substanzen von Vorteil, da sie meist gut aufgereinigt werden können. Für biologische Untersuchungen stellen solche Moleküle jedoch oft eine Herausforderung dar, da ihr lipophiler Charakter zu Löslichkeitsproblemen in der Zellkultur oder biologischen Puffern führt. Gleichzeitig kann eine hohe Lipophilie einen positiven Einfluss auf die Zellaufnahme haben. Eine Möglichkeit auf die Löslichkeit Einfluss zu nehmen ist die in Kapitel 2.3 und 4.4 erwähnte chemische Veränderung der Komplexe. Ziel ist dabei die Löslichkeit zu verbessern, jedoch die gewünschte Aktivität der Struktur zu behalten. Eine weitere Möglichkeit hierfür ist die schwer löslichen Wirkstoffe mit Hilfe von Lösungsvermittlern für die verschiedenen biologischen Untersuchungen zugänglich zu machen. Als Beispiel seien hier Komplexbildner wie Natriumbenzoat, Tenside in Form von Lecithinen oder andere Substanzen wie Glycerol genannt. [125, 128, 130, 229–231] Es gibt verschiedene Varianten, um die Löslichkeit zu verbessern, jedoch müssen diese zur Substanz und zum Versuch selbst passen. So ist zum Beispiel unter Medizinern die Nutzung von Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösemittel sehr gängig. Bei Metallkomplexen stellt die Koordinationsfähigkeit von DMSO zu Metallen jedoch ein großes Problem dar. [232] Es kann zu einem Ligandenaustausch kommen und es würde eine neue Verbindung entstehen, die evtl. andere Eigenschaften hat. Basierend auf diesen Gedanken wäre ein Lösungsvermittler ideal, der nicht mit dem Wirkstoff reagiert und keinen Einfluss auf Versuche zeigt. Lipidcarrier in Form von Nanoemulsionen sind eine vielversprechende Gruppe von Lösungsvermittlern, sodass ihre Kombination mit den Phosphan-Au(I)-Alkinen von Interesse ist. [125]

Andermark et al. haben erste Versuche dazu durchgeführt, die für die in den folgenden Kapiteln gezeigten Formulierungsversuche als Grundlage dienen. Die Komplexe **Ref2** und **Ref3** werden als Kandidaten für eine Lipidnanocarrierbeladung ausgewählt und die dazugehörigen Versuche im nachstehenden Kapitel dargestellt.

Zum Ende des Kapitels werden die im Arbeitskreis neu hergestellten Phosphan-Au(I)-Alkine (Vergleich Kapitel 2.3 und 4.4) nochmal betrachtet und deren Potential als Zytostatika innerhalb der Substanzklasse verglichen.

6.1 Auswahl der Nanoformulierung

Wie bereits in der Projektvorstellung (Kapitel 2.3) erklärt, erfolgte dieser Abschnitt der Arbeit in Kooperation mit Dr. Katrin Göke aus dem Arbeitskreis von Prof. Bunjes der Pharmazeutischen Technologie. Erste Versuche wurden von Vincent Andermark und Dr. Katrin Göke mit Dynasan, Mischmizellen und Erdnussöl durchgeführt. [51] Dr. Katrin Göke entschied aufgrund von geringer Wirkstoffaufnahme aus den ersten Versuchen und besserer Haltbarkeit, Verarbeitung und Verträglichkeit andere Emulsionen zu untersuchen, die sie zur Beladung zur Verfügung stellte.

Miglyol 812 ist ein mittelkettiges eher polares Fett. Rapsöl enthält langkettige ungesättigte Fettsäuren und ähnelt in seiner Struktur dem Erdnussöl, was in den ersten Versuchen am meisten Wirkstoff aufgenommen hat. Beide werden als Nanoemulsion verwendet. Des Weiteren sollen Liposomen untersucht werden (siehe Abbildung 71).

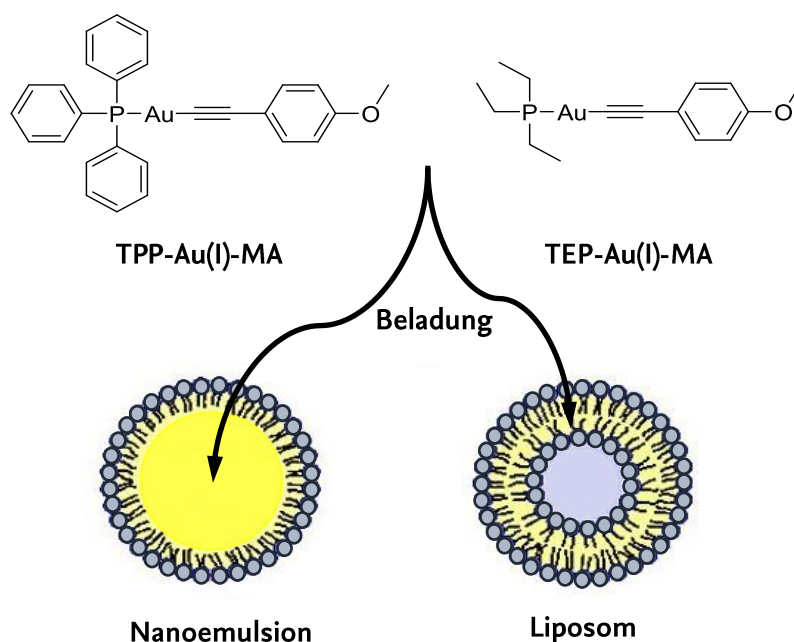


Abbildung 71 Beladung der Nanocarrier mit Ref₂ und Ref₃ (blau: hydrophiler Teil, gelb: lipophiler Teil)

Nanoemulsionen bilden einen Monolayer mit einem lipophilen Kern, in dem der Wirkstoff besser löslich ist. [129] Liposomen bestehen aus einer Doppelschicht mit lipophilem Bereich und einem hydrophilen Kern.

Alle von Dr. Göke hergestellten Zubereitungen enthalten 2,25 % Glycerol zur Isotonisierung. Die wässrige Phase der Emulsionen besteht aus 82,75 % Wasser, die der Liposomen aus Phosphatpuffer (pH 7,4, 10 mM). Bezeichnung, Art der Carrier, Zusammensetzung, Herstellungsmethode und Partikelgröße finden sich in Tabelle 22.

Zubereitung	Art	Zusammensetzung	Herstellung	Partikelgröße
M812 HH	Emulsion	10 % Miglyol 812 5 % Poloxamer 188	Hochdruck-homogenisation	91 nm
M812 ME	Emulsion	10 % Miglyol 812 5 % Poloxamer 188	Membranextrusion	120 nm
Rapsöl HH	Emulsion	10 % Rapsöl 5 % Poloxamer 188	Hochdruck-homogenisation	121 nm
Rapsöl ME	Emulsion	10 % Rapsöl 5 % Poloxamer 188	Membranextrusion	153 nm
Rapsöl ME konserviert	Emulsion	10 % Rapsöl 5 % Poloxamer 188 0,1 % Natriumazid	Membranextrusion	153 nm
Liposomen	Liposomen	Lipoid S 100 (Phospholipid)	Membranextrusion	92 nm

Tabelle 22 Zusammensetzung und Zusatzinformationen zu den Lipidcarriern

Eine Rapsölemulsion wird zusätzlich mit 0,1 % Natriumazid konserviert. Gleichzeitig werden zwei Herstellungsmethoden miteinander verglichen. Bei der Hochdruckhomogenisation (HH) könnten geringe Mengen Metall in die Probe abgegeben werden, was bei der Membranextrusion (ME) nicht der Fall ist. Ob die Herstellungsmethode Einfluss auf die Zellen oder die Beladung hat, soll deshalb ebenfalls beobachtet werden.

Als erstes wird untersucht, ob die Carrier das Zellwachstum beeinflussen, wobei die IC_{50} -Bestimmung hierfür angepasst wird (siehe Kapitel 8.7.1). Dafür werden verschiedene Volumenkonzentrationen der Carrier auf die vier bereits erwähnten Zelllinien aufgetragen und ihr antiproliferativer Effekt bestimmt (siehe Tabelle 23).

Carrier	HT-29	MCF-7	MDA	RC-124
M812 HH	> 10	1,3 \pm 0,8	> 10	0,6 \pm 0,3
M812 ME	> 10	0,5 \pm 0,3	3,4 \pm 0,1	1,3 \pm 1,2
Rapsöl HH	> 10	0,5 \pm 0,1	1,2	2,8
Rapsöl ME	> 10	0,7 \pm 0,1	0,8 \pm 0,1	1
Rapsöl ME konserviert	0,7 \pm 0,3	0,6 \pm 0,4	0,5 \pm 0,1	0,3 \pm 0,2
Liposomen	0,7	0,2 \pm 0,21	0,1 \pm 0,0	0,3

Tabelle 23 IC₅₀ in Volumenprozent [%] der sechs Carrier bei den vier genutzten Zelllinien

Für alle Carrier lässt sich eine Wachstumsinhibition erkennen, lediglich die Kolonkarzinomzellen HT-29 scheinen die Lösungsvermittler gut zu vertragen. Das Liposom und das konservierte Rapsöl zeigen jedoch auch auf die HT-29-Zellen einen wachstumshindernden Einfluss. Vergleicht man Miglyol und Rapsöl, lässt sich keine Tendenz erkennen. Die Nanoemulsionen, die mittels Hochdruckhomogenisation hergestellt wurden, scheinen einen minimal kleineren Einfluss auf die Zellen zu haben. Dass die Carrier überhaupt einen Effekt zeigen, überrascht, da die genutzten Nanoemulsionen und das Liposom für ihre gute Verträglichkeit bekannt sind. Es gibt immer mehr Forschungsergebnisse, die schwerlösliche Wirkstoffe in Lösungsvermittlern zeigen. Es wird sogar die Möglichkeit diskutiert, multiresistente Krebsarten im Wachstum zu hemmen, wenn Wirkstoffe mit Nanoemulsionen kombiniert werden. [125]

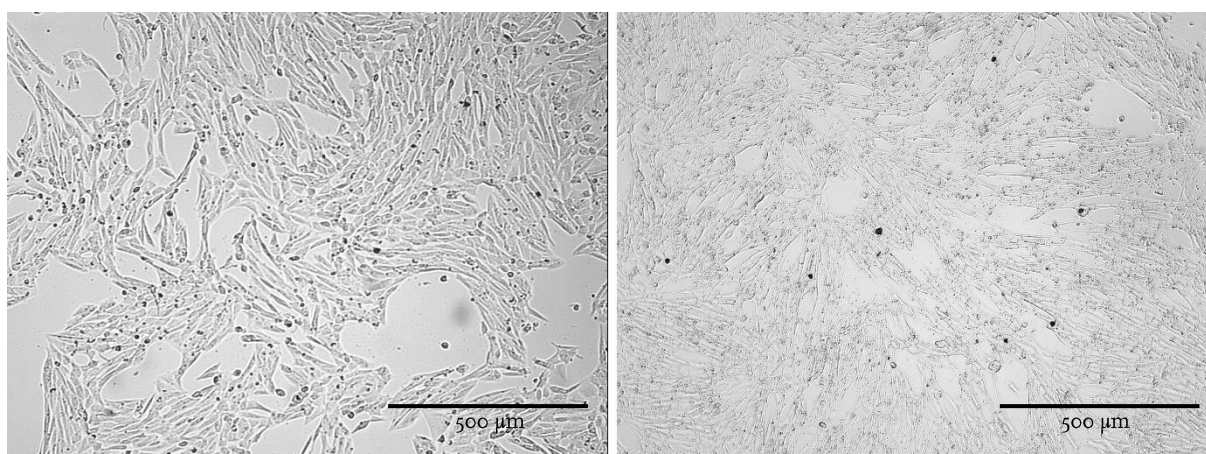


Abbildung 72 RC-124-Zellen links: Medium, rechts: Medium mit 10 % Liposom

Die Zellen unserer Zellkultur scheinen jedoch unter normalen Bedingungen von den reinen Nanoemulsionen im Wachstum gestört zu werden. Sie zeigen unter Inkubationsbedingungen

mit den Nanocarriern sogar morphologische Veränderungen, was am Beispiel der Liposomen in Abbildung 72 zu sehen ist. Die Zellgrenzen scheinen nicht klar definiert und der Zellrasen wirkt eher schlierig, wofür jedoch keine Erklärung gefunden wurde.

Da große Volumina der Lösungsvermittler auf die Zellen gegeben werden, könnte dies allein Einfluss auf das Wachstum haben. Die Carrier könnten im Medium sedimentieren und eine Art Barriere zwischen Zellrasen und Medium schaffen. Es ist ebenfalls möglich, dass die Carrier im genutzten Medium nicht stabil sind und Zersetzungsprodukte das Wachstum der Zellen stören. Im schlimmsten Fall interagieren die Carrier mit den Zellmembranen und führen so zu einem gestörten Wachstum, was aber reine Mutmaßung ist.

Um sicherzustellen, dass die Nanoemulsionen im Zellkulturmedium stabil bleiben, werden Proben der Lipidnanocarrier zu 10 % in Medium gelöst und unter Inkubationsbedingungen 96 h (maximale Inkubationszeit für Antiproliferationsversuche) im Brutschrank aufbewahrt. Danach wird mittels Laserdiffraktometrie, kombiniert mit *Polarization Intensity Differential Scattering* (PIDS) (Beckman Coulter LS13320) die Partikelgröße von Dr. Göke erneut bestimmt.

Carrier	Partikelgröße vorher [nm]	Partikelgröße nachher [nm]
M812 HH	91	112
M812 ME	120	131
Rapsöl HH	121	120
Rapsöl ME	153	154
Rapsöl ME konserviert	153	1453
Liposomen	92	87

Tabelle 24 Partikelgröße [nm] vor und nach der Inkubation in Zellkulturmedium

Es zeigt sich, dass die Carrier im Medium im Hinblick auf ihre Partikelgröße stabil sind (siehe Tabelle 24). Das konservierte Rapsöl stellt allerdings eine Ausnahme dar. Die Partikel vergrößern sich sichtlich und es ist eine Aufrahmung in der Probe zu erkennen. Die minimale Erhöhung der Partikelgröße der Miglyolproben ist vernachlässigbar, da sie auch unter normalen Lagerungsbedingungen stattfindet und somit nicht auf eine Interaktion mit dem Medium zurückzuführen ist.

Um den Einfluss auf die Zellen zu reduzieren, erhöht Dr. Göke den Fettgehalt für Miglyol und Rapsöl auf 20 %. Gleichzeitig wird der Emulgatorgehalt auf 10 % angepasst und die Emulsionen enthalten 2,25 % Glycerol und 67,75 % Wasser.

Der Fettgehalt im Medium wird für einen weiteren Test der Wachstumsinhibition beibehalten, jedoch muss durch die Verdopplung des Fettgehalts in der Emulsion nur die Hälfte des Volumens eingesetzt werden.

Da im ersten Versuch die Hochdruckhomogenisation etwas größere IC_{50} -Werte zeigte, werden für das weitere Vorgehen die Nanoemulsionen nur noch mittels dieser Methode hergestellt. Eine Konservierung und das Liposom werden aufgrund der vorherigen Ergebnisse verworfen.

Die Partikelgröße für die 20 prozentige Miglyolemulsion beträgt 80 nm und für das Rapsöl 86 nm, hier werden also noch kleinere Partikel als im ersten Versuch erreicht.

Die IC_{50} -Werte in Tabelle 25 zeigen, dass die Carrier auch mit 20 % Fettgehalt einen Einfluss auf das Zellwachstum haben, der antiproliferative Effekt wird aber minimal reduziert. Da die Kolonizellen in allen Versuchen ohne Störung wachsen können, wird für eine Zellaufnahme diese Zelllinie gewählt. Bei der Auswertung der antiproliferativen und zytotoxischen Effekte von beladenen Nanoemulsionen muss bedacht werden, dass die Carrier selbst schon einen Effekt an den verwendeten Zellen aufweisen.

Carrier	HT-29	MCF-7	MDA	RC-124
M812 HH	> 5	2,8 ^{±1,2}	> 5	0,2 ^{±0,0}
Rapsöl HH	> 5	3,7	2,0 ^{±0,3}	0,3 ^{±0,1}

Tabelle 25 IC_{50} -Werte in Volumenprozent [%] von Miglyol und Rapsöl mit 20 % Fettanteil bei den vier genutzten Zelllinien

6.2 Beladung und Goldgehaltmessung

Die Beladung der zwei Nanoemulsionen erfolgt anhand Vorschrift 8.7.2. Die Nanoemulsionen werden zuerst mit einem bzw. mit zwei Äquivalenten Komplex inkubiert, um zu sehen, ob ein Überschuss des gemörserten Komplexes auch zu einer höheren Beladung führt. Bei allen Ansätzen ist nach einer Woche ein Rest Feststoff im Vial sichtbar. Dies zeigt, dass definitiv nicht die gesamte Menge an Komplex von der Emulsion aufgenommen wird. Nach Filtration werden die Proben wie in Kapitel 8.6.14 beschrieben verarbeitet, um den Goldgehalt mittel HR-CS AAS zu bestimmen, wobei während der analytische Messung einige Probleme auftreten.

In einem ersten Versuch werden die Proben für die Gehaltsbestimmung am HR-CS AAS nicht 1 zu 99 mit rH₂O verdünnt, sondern direkt mit den Modifiern versetzt und vermessen. Dies stellte sich jedoch als problematisch heraus, da die direkte Vermessung der Proben sehr hohe Absorptionen zeigt und die Signale weit über dem linearen Bereich liegen. Deshalb werden zwei

zusätzliche Verdünnungen ausprobiert. Wahrscheinlich führt jedoch der hohe Fettanteil der Proben zu einer Akkumulation in Schlauchsystem und Ofen. Die Ergebnisse in Tabelle 26 zeigen, dass eine Akkumulation sehr wahrscheinlich ist, da trotz stärkerer Verdünnung die Proben immer mehr Gold zu enthalten scheinen.

Probe	Verdünnungsfaktor	Messposition	Gehalt [μM]
Ref3/Raps 1/1	1	1	192,3
Ref3/Raps 1/1	3	3	501,0
Ref3/Raps 1/1	10	5	1127,1

Tabelle 26 Informationen zur Gehaltsbestimmung von Ref3 im Verhältnis 1 zu 1 mit der 20 %en Rapsölemulsion

Dies ließ sich mit der Standardspüllösung sowie dem Reinigungsprogramm des Ofens nicht beseitigen. Eine Komplettreinigung des Ofens, sowie ein neues Schlauchsystem waren nötig, um alle Reste der Proben zu entfernen. Aus diesem Grund wird eine 100-fache Verdünnung mit rH₂O eingeführt, die dazu führt, dass die Absorptionen der Proben im linearen Bereich liegen und das Gerät nicht verunreinigt wird.

Die Nanoemulsionen zeigen des Weiteren ein anderes Oberflächenverhalten als die sonst vermessenen Proteingemische, sodass auch eine Anpassung des Ofenprogramms nötig ist. Um eine einheitliche Veraschung zu gewährleisten, müssen die Proben möglichst gleichmäßig im Graphitrohr trocknen. Eine Blasenbildung und Platzen dieser stören den Prozess. Miglyol und Rapsöl zeigen bei Durchführung des normalen Ofenprogramms für Gold jedoch extremes Spritzen sowie Rauchentwicklung im Ofen. Da die Aufheizphase des Ofens nicht weit in die Länge gezogen werden kann, um Ofen und Graphitrohr nicht zu stark zu strapazieren, wird nach einem Kompromiss gesucht und das Ofenprogramm mit Hilfe von Dr. Claudia Schmidt angepasst. Dazu werden zusätzliche Trockenschritte eingefügt und diese wiederum verlängert, sodass ein langsames Trocknen der Proben gewährleistet wird. Die einzelnen Schritte finden sich in Kapitel 8.6.14 in Tabelle 41.

Unter den angepassten Bedingungen kann für Rapsöl eine einheitliche Veraschung sichergestellt werden. Das Miglyol ist unter allen getesteten Bedingungen nur schwer zu veraschen, sodass Rapsöl als Kandidat für die endgültigen Versuche ausgewählt wird.

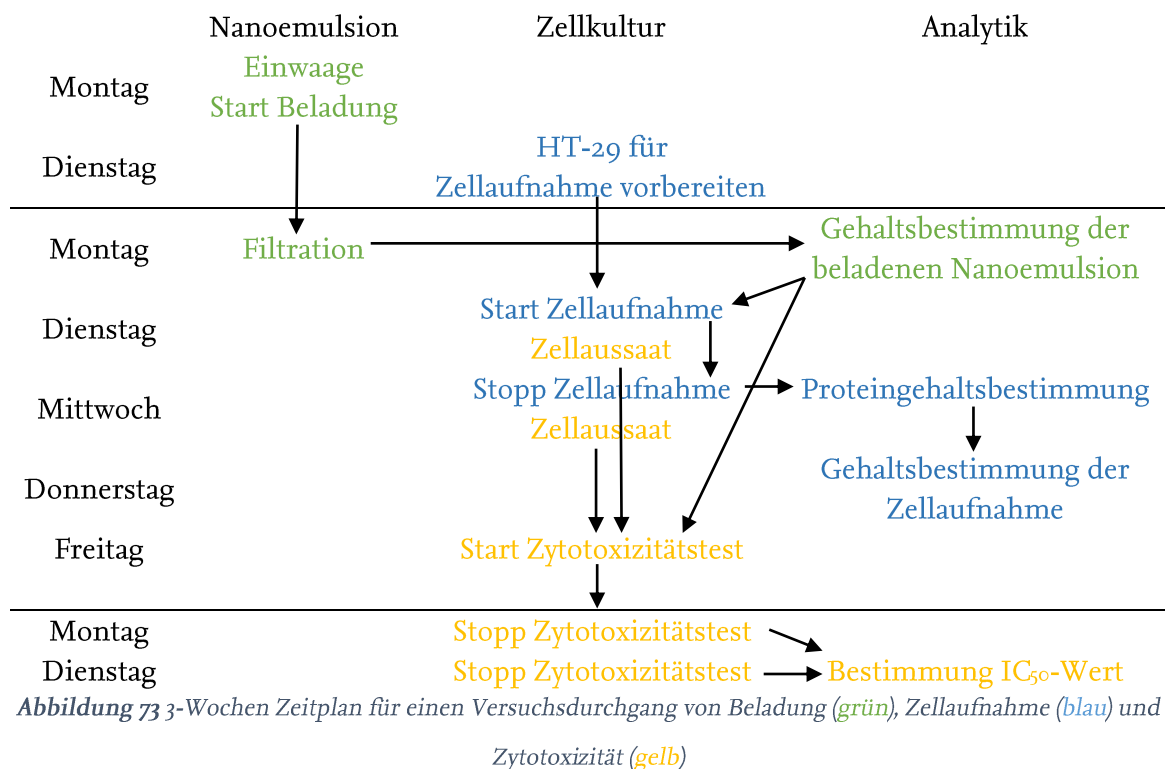
Mit einem Verdünnungsschritt und dem angepassten Ofenprogramm lassen sich die lipidhaltigen Proben nun störungsfrei vermessen.

Betrachtet man die gemessenen Goldgehalte dieser Versuchsreihe, stellt sich zudem heraus, dass ein Überschuss des Komplexes keine Verbesserung der Beladung mit sich bringt, sodass für die abschließenden Versuche ein Verhältnis von 1 zu 1 gewählt wird. Tabelle 27 zeigt die Gehalte der zwei Proben von Ref₃ in den beiden Nanoemulsionen. Man erkennt, dass eine Verdopplung der Wirkstoffeinwaage keine signifikante Erhöhung der Gehalte mit sich bringt. Die Rapsölemulsion scheint den Komplex zusätzlich etwas besser aufzunehmen, was ebenfalls für diesen Lösungsvermittler spricht.

Verhältnis Komplex/Emulsion	Gehalt [μM] in M812	Gehalt [μM] in Rapsöl
1 zu 1	151,2	192,3
2 zu 1	154,1	194,2

Tabelle 27 Einfluss der Komplexmenge von Ref₃ auf die Nanoemulsionsbeladung

Basierend auf diesen Vorversuchen wird die 20-prozentige Rapsölemulsion als Carrier ausgewählt. Für Ref₂ sowie Ref₃ werden je drei Ansätze hergestellt und der Goldgehalt, die IC₅₀-Werte und die Zellaufnahme ermittelt. Hierfür müssen die Versuche wegen der unbekannten Stabilität in kürzester Zeit stattfinden. Zusätzlich muss die Vorbereitung im Biolabor klar geplant sein, da für die verschiedenen Versuche Zellen bereits früher angezüchtet werden müssen. Der Zeitplan für einen Durchgang findet sich in Abbildung 73.



Die Beladungsdaten und Gehalte für die Versuchsreihe finden sich in Tabelle 28, die Komplexe werden alle in 2 ml Nanoemulsion inkubiert. Im Vergleich zu den ersten Versuchen von Andermark et al. [51], bei denen Gehalte von 0,009 bis 0,098 mg/ml erreicht wurden, ist eine deutliche Verbesserung der Beladung zu sehen. Dies hat zum einen mit den Nanoemulsionen selbst zu tun, zum anderen scheint die Beladung unter Lichtausschluss und vorheriges Mörsern der Komplexe besser zu funktionieren, wobei **Ref3** im Vergleich zu **Ref2** in höheren Mengen von der Nanoemulsion aufgenommen wird.

Substanz	Durchgang	Einwaage [mg]	Gehalt [mM]	Gehalt [mg/ml]
Ref2	1	1,97	0,0311	0,0184
	2	1,95	0,2067	0,1222
	3	2,01	0,4065	0,2400
Ref3	1	2,06	0,9974	0,4451
	2	2,04	1,6856	0,7523
	3	2,12	1,3975	0,6237

Tabelle 28 Einwaage und Wirkstoffgehalt der Rapsölemulsion

Die Durchgänge untereinander zeigen eine Standardabweichung von 0,11 bis 0,15 mg/ml, was für einen einzelnen Einwaage- und Lösungsschritt hoch ist. Dies kann verschiedene Gründe haben. Trotz des Zerkleinerungsvorgangs im Handmörser können unterschiedlich große Partikel eingewogen worden sein. Andermark et al. haben schon darauf hingewiesen, dass eine Zerkleinerung des Komplexpulvers zu einer besseren Beladung führt. Wahrscheinlich spielt die Verteilung der Partikel beim Lösen ebenfalls eine Rolle. Ein Einstreuen der Substanz in die Nanoemulsion könnte sich im Vergleich zum Vorlegen des Komplexes und Übergießen mit Nanoemulsion durch eine bessere Benetzung positiv auf die Beladung auswirken. Dies ist während des Einwiegens jedoch schwer umsetzbar. Die Ansätze werden am Anfang der Inkubation einmal kurz durchmischt und der Lösungsvorgang erfolgt unter ständigem Schwenken. Eine dauerhafte Durchmischung könnte an dieser Stelle den Beladungsvorgang weiter verbessern.

Mit einem Startvolumen von 2 ml sollte je nach Beladung genug Material für eine Gehaltsbestimmung, den Zytotoxizitätsassay und die Zellaufnahmeuntersuchung vorliegen. Man hat jedoch beim Filtrieren, Umfüllen, Pipettieren etc. einen gewissen Verlust und Wiederholungen eines Versuchs sind mit dieser Menge daher kaum durchführbar.

6.3 Zytotoxizität

Die Untersuchung der antiproliferativen und zytotoxischen Effekte erfolgt wie in Kapitel 8.6.8 und 8.7.3 beschrieben. Die Testkonzentrationen sollen dabei 10 μM , 8 μM , 5 μM , 4 μM , 2 μM , 1 μM und 0,5 μM betragen. Die Beladung reicht bei einigen Proben nicht für einen Testversuch bis zu 10 μM . Deshalb wird für alle Proben folgende Verdünnungsreihe gewählt: 1 μM , 0,8 μM , 0,5 μM , 0,4 μM , 0,2 μM , 0,1 μM und 0,05 μM . Die Konzentrationen liegen unter den IC_{50} -Werten für **Ref2** und **Ref3**, falls jedoch eine verbesserte Aufnahme der Komplexe durch die Nanocarrier vorliegt, können evtl. doch Effekte beobachtet werden.

Testemulsion	HT-29	MCF-7	MDA	RC-124
Ref2 Raps 20 HH	> 1	> 1	> 1	> 1
Ref3 Raps 20 HH	> 1	> 1	> 1	> 1

Tabelle 29 IC_{50} -Werte [μM] der beladenen Nanocarrier gegen die vier Testzelllinien

Tabelle 29 zeigt die ermittelten IC_{50} -Werte. Es lässt sich erkennen, dass bis zu einer Konzentration von 1 μM keine antiproliferative Wirkung erkennbar ist. Dies war in Bezug auf die geringe Komplexkonzentration zu erwarten. Aus den Ergebnissen lässt sich aber trotzdem ableiten, dass eine Inkubation mit beladenen Nanoemulsionen möglich ist und die Zellen die verwendeten Mengen zu vertragen scheinen. Ist eine ausreichende Beladung gegeben, können problemlos auch Versuche in der Zellkultur mit den Nanoemulsionen durchgeführt werden.

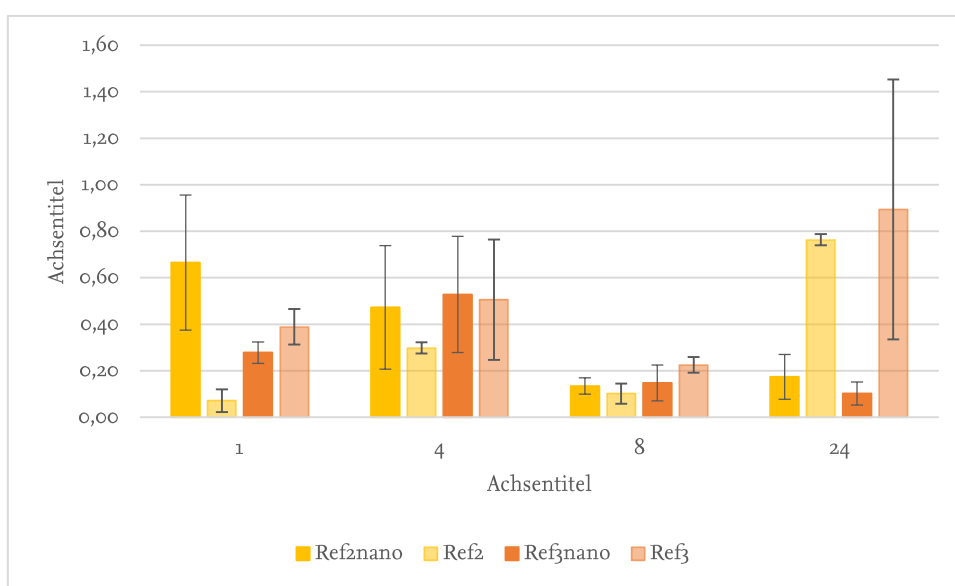
6.4 Zellaufnahme

Für die Phosphan-Au(I)-Alkine ist ein eindeutiger Wirkmechanismus noch nicht geklärt, deshalb ist es von Interesse zu schauen, ob die Komplexe in die Zelle gelangen. Die Nanoemulsionen als Lösungsvermittler könnten hier zum Beispiel über Endocytose eine Aufnahme der Goldkomplexe verbessern.

Die beladenen Nanoemulsionen werden deshalb ebenfalls einer Zellaufnahmestudie unterzogen. Die Konzentration, mit der die HT-29-Zellen inkubiert werden, wird auf 10 μM festgelegt, um definitiv eine Zellaufnahme zu erreichen. Da die reinen Komplexe bei 10 μM das Wachstum der Zellen während der Inkubation zu stark reduzieren würden, wird ein Vergleich mit diesen bei 5 μM durchgeführt. Interessante Zeitpunkte liegen bei 1 h, 4 h, 8h und 24 h. Die Vorgehensweise ist in Kapitel 8.6.11 und 8.7.4 beschrieben.

Die beladenen Nanoemulsionen zeigen eine Zellaufnahme (Abbildung 74), die im Bereich der reinen Komplexe liegt. Bei dem Vergleich darf jedoch nicht vergessen werden, dass die Nanoemulsionen mit einer doppelt so hohen Inkubationskonzentration vermessen werden. Deutlich wird auf jeden Fall, dass die Komplexe eingebettet in die Nanoemulsion die Zielzellen erreichen und ein Goldgehalt im tiefen nanomolaren Bereich gemessen werden kann.

Die Aufnahme scheint sogar schon zu Beginn der Testreihe stattzufinden, wohingegen die Phosphan-Au(I)-Alkine als Reinsubstanz mit der Zeit in den Zellen akkumulieren. Die Nanoemulsion scheint somit die Aufnahme zu beschleunigen, was interessante Möglichkeiten im Hinblick auf Freisetzung, Bioverfügbarkeit und Verteilung bietet.



*Abbildung 74 Zeitabhängiger Goldgehalt [nmol/mg Protein] für die beladenen Nanoemulsionen [10 μ M] und die freien Komplexe **Ref2** und **Ref3** [5 μ M]*

6.5 Vergleich der biologischen Aktivität der Phosphan-Au(I)-Alkine

Ref2 und **Ref3** werden als interessanteste Kandidaten für die Formulierungsversuche verwendet, gleichzeitig wird die Struktur von **Ref3** chemisch überarbeitet (siehe Kapitel 2.3 und 4.4). Die neuen Phosphan-Au(I)-Alkine mit Triethylphosphan sind zum einen viel einfacher löslich als das stark lipophile Triphenylphosphan. Zum anderen werden durch die Modifikation auf der Alkinseite neue Daten in Bezug auf mögliche Liganden und Ligandeneffekte gesammelt. In Kapitel 2.3 sind in Abbildung 21, Abbildung 22 und Abbildung 23 die von Andreas Meyer, Vincent Andermark, Dr. Svenja Kankowski und Andre Prause synthetisierten Phosphan-Au(I)-Alkine dargestellt. Im Folgenden sollen exemplarisch die Aktivität dieser Klasse diskutiert werden und

mögliche Schlüsse in Hinblick auf Strukturwirkungsbeziehungen aus den gesammelten Daten der bereits erwähnten Arbeiten gezogen werden.

Alle getesteten Phosphan-Au(I)-Alkine weisen IC_{50} -Werte im einstelligen mikromolaren Bereich auf. Nimmt man Proliferationshemmung und Enzyminhibition zusammen, sind aus den ersten Arbeiten **Ref2** und **Ref3** die Komplexe mit dem höchsten Potential, weshalb sie auch für weitere Untersuchungen ausgewählt wurden. Die neuen Komplexe mit Triethylphosphan und unterschiedlichen Alkinen zeigen alle gute antiproliferative Effekte und hemmen die TrxR genauso gut wie die Vorgänger. Da die Komplexe alle relativ ähnliche Aktivitäten (ca. 0,5 bis 13 μM) zeigen, sind Schlüsse für Strukturwirkungsbeziehungen schwer zu ziehen.

Tabelle 30 zeigt eine kleine Auswahl der in Kapitel 2.3 gezeigten Phosphan-Au(I)-Alkine, die das Methoxyalkin tragen, und die passenden Vertreter aus den beiden anderen besprochenen Komplexklassen in Bezug auf ihre Wirkung auf HT-29-Zellen und die Inhibition der TrxR. Die Ergebnistabelle ist zudem zweigeteilt, wobei der erste Teil (grau) Auszüge der Ergebnisse von Rubbiani, Meyer und Andermark zeigt und Komplex **23** zum Vergleich aufgenommen wird. Der zweite Teil beinhaltet Ergebnisse von Kankowski und Prause, **Ref3** erscheint dabei zweimal mit unterschiedlichen IC_{50} -Werten, die wie bereits erklärt auf zwei verschiedenen Zellchargen beruhen. Wie bei den NHC-Au(I)-Alkinen fand zwischen den Messungen eine Zellkulturerneuerung statt. Damit die Werte besser miteinander verglichen werden können, ist **Ref3** doppelt getestet worden, dies soll das Abschätzen des Potentials erleichtern.

Substanz	Struktur	HT-29	TrxR
Ref1	HB-Ethyl-Au-TPP	0,4 \pm 0,2	0,03 \pm 0,01
Ref2	TPP-Au-MA	5,0 \pm 0,3	0,05 \pm 0,03
Ref3 (alt)	TEP-Au-MA	2,6 \pm 0,1	0,06 \pm 0,01
23	HB-Ethyl-Au-MA	1,5 \pm 0,4	0,05 \pm 0,01
Ref3 (neu)	TEP-Au-MA	10,8 \pm 2,2	0,01 \pm 0,00
Ref3-meta	TEP-Au-mMA	9,2 \pm 4,0	0,53 \pm 0,0
Ref3-ortho	TEP-Au-oMA	11,6 \pm 0,8	0,47 \pm 0,02

Tabelle 30 IC_{50} -Werte an HT-29 [μM] und für TrxR [μM] [51, 60, 126, 127]

Vergleicht man die IC_{50} -Werte für die HT-29-Zellen unter Einbezug der Zellkulturerneuerung, erreichen alle Komplexe eine gute antiproliferative Wirkung. Wie erwähnt, sind zwischen den

verschiedenen Liganden nur minimale Aktivitätsunterschiede ersichtlich, sodass nur die Aussage getroffen werden kann, dass die Komplexe alle gute Wachstumsinhibitoren sind.

Bei der TrxR verhalten sich die Ergebnisse ähnlich, da die Komplexe das Enzym im nanomolaren Bereich (0,05 bis 1,5 μM) inhibieren. Die Komplexe sind alle als gute Inhibitoren einzuschätzen. Wie bei den NHC-Au(I)-Alkinen weisen die Komplexe mit größeren Liganden eine verringerte Aktivität auf. Besonders auffällig ist, dass bei Änderung der Substitutionsposition des Methoxyalkins die Aktivität um den Faktor 10 sinkt. Das ist ein Hinweis, dass die Position des Aromatenrests der Alkinliganden relevant für die Interaktion mit der TrxR ist. Ob sich diese Beobachtung auch auf die NHC-Au(I)-Alkine übertragen lässt, müsste weiter untersucht werden.

Insgesamt kann man aus den gesammelten Daten die Schlussfolgerung ziehen, dass eine Vielzahl an Liganden für die Phosphan-Au(I)-Alkine in Frage kommt. Für Strukturwirkungsbeziehungen sind diese Daten wenig aussagekräftig. Möchte man aber ein großes Wirkstoffscreening durchführen, sind die Phosphan-Au(I)-Alkine eine geeignete Komplexklasse hierfür.

7 Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Die gezeigten Daten für die NHC-Au(I)-Alkine werden im Folgenden zusammengefasst und diskutiert. Die formulierten Ziele werden überprüft und die verschiedenen Arbeitsbereiche (Kapitel 3, 4 und 5) miteinander in Beziehung gesetzt, wobei einige Themen bereits in den jeweiligen Kapiteln ausführlich betrachtet wurden und deshalb im Folgenden nicht im gleichen Ausmaß erläutert werden. Anschließend werden die Daten der Phosphan-Au(I)-Alkine zusammengefasst und die Ergebnisse der Untersuchungen mittels Lipidnanocarrier bewertet. Abschließend werden sinnvolle Folgeziele und Aufgaben formuliert, die für die Gold(I)-Alkine interessant sind (siehe Kapitel 7.2).

7.1 Zusammenfassung und Diskussion

Die NHC-Au(I)-Alkine als neue Substanzklasse zeigen interessante Eigenschaften, die auf eine potente und leicht herzustellende Wirkstoffgruppe hindeuten.

Die Synthese der Komplexe kann wie in Kapitel 4.2 beschrieben unter einfachen Laborbedingungen durchgeführt werden und ist auf verschiedene NHC- und Alkinliganden übertragbar. Dies ist von großer Bedeutung, da dadurch das Repertoire der möglichen Kombinationen von Metall und Liganden deutlich vergrößert wird, ohne dass zusätzliche Geräte oder Methoden im Arbeitskreis eingeführt werden müssen. Die ersten Versuche deuten auf eine Säurelabilität der NHC-Au(I)-Alkine hin, sodass das saure Kieselgel für die Synthese, Aufreinigung oder Analytik als problematisch einzustufen ist. Der Ausschluss von Kieselgel von der Herstellung der NHC-Au(I)-Alkine war ein ausschlaggebender Schritt in der Syntheseentwicklung. Der Ligandenaustausch findet unter Deprotonierung des Alkins und Wärmezufuhr statt. Die Komplexe können mittels Flüssigextraktion aufgereinigt werden und die Reinheit ist hoch genug, um die Komplexe biologischen Versuchen zu unterziehen. Die Löslichkeit der NHC-Au(I)-Alkine ist ebenfalls ausreichend, sodass keine Probleme während verschiedener Untersuchungen aufgetreten sind. Die neue Substanzklasse lässt sich mittels NMR-Spektroskopie sehr gut analysieren und spezielle Ligandeneigenschaften zeigen sich in konstanter Regelmäßigkeit in der Massenspektrometrie, sodass die Synthesekontrolle und Charakterisierung relativ einfach ausfallen.

Die von Dr. Munoz Castro errechneten Daten liefern viele Hinweise auf die Eigenschaften der neuen Komplexklasse (siehe Kapitel 3). Diese können für die Erklärung von Aktivitäten oder Reaktionen hilfreich sein.

Für die NHC-Au(I)-Alkine ist ersichtlich, dass der Alkinligand durch eine kürzere Bindung näher an das Goldzentralatom gebunden ist als der Chloridoligand der Vorstufe. Im Vergleich zum Phosphan-Au(I)-Alkin ist die Bindung von NHC und Gold(I) deutlich kürzer als die von Phosphan und Gold(I). Die beiden Liganden sind innerhalb der NHC-Au(I)-Alkine relativ gleich weit vom Goldzentralatom entfernt. Abbildung 75 verdeutlicht die Ergebnisse.

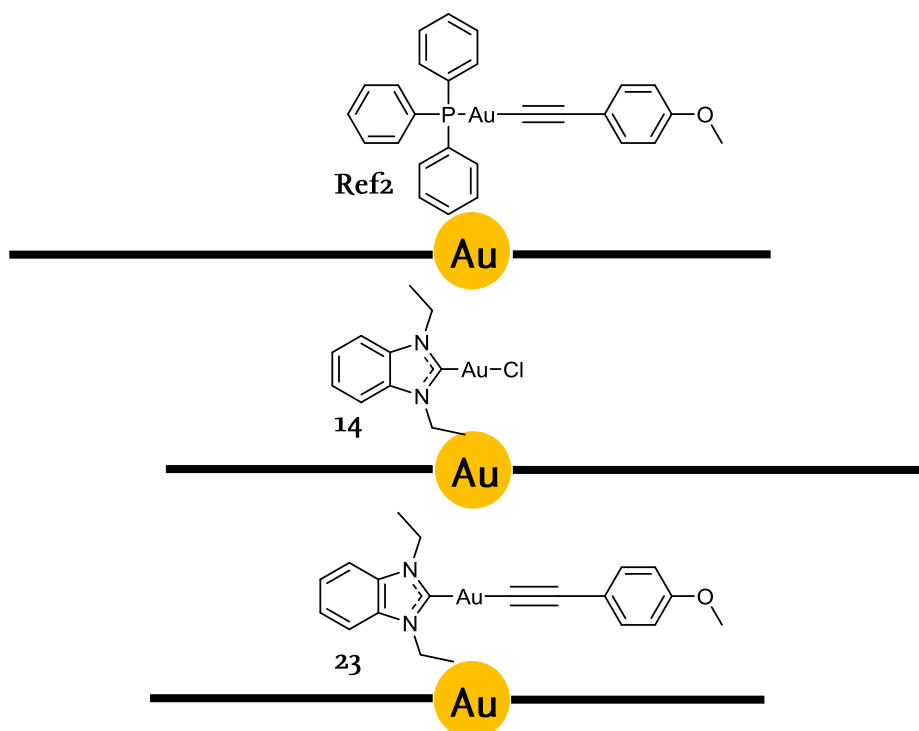


Abbildung 75 Schematische Darstellung der Bindungslängen der Komplexe **Ref2**, **14** und **23** (links Bindungslänge zu NHC bzw. Phosphan, rechts Bindungslänge zu Alkin bzw. Chlorido)

Was die Winkel der Aromatenebenen der Liganden betrifft, fallen mehrere Daten auf. Alle am Stickstoff ethylierten Komplexe scheinen stärker verdreht als die methylierten Partner. Dies ist durch die räumlich größeren Reste an den Stickstoffen nicht verwunderlich, da die Ethylgruppen mit ihrer freien Drehbarkeit auch in Richtung Zentralatom ragen und somit den Alkinaromaten zum Verdrehen zwingen.

Man muss zudem bedenken, dass eine Substitution an 5-Position der NHC-Liganden einen Einfluss auf das gesamte Molekül hat. Wasserstoff- und Fluorreste mit ihren relativ kleinen Van-der-Waals-Radien beeinflussen die Stickstoffreste sterisch zwar relativ wenig, es sind allerdings trotzdem Unterschiede sichtbar. Die Fluorreste (**28**, **31** und **34**) führen eher zu kleinen Winkeln,

während die unsubstituierten NHCs (23, 29, 32, 33 und 34) eine größere Verdrehung zeigen. Imidazol (20 und 21) und der Carbonsäureester (26 und 27) zeigen zudem deutlich kleinere Winkel.

Es fällt somit auf, dass die Winkel stark von den Stickstoffresten und der NHC-Substitution abhängen. Da die Reste sich durch ihre räumliche Ausdehnung beeinflussen, sind je nach Liganden verschiedenen Konformationen am günstigsten. Zum einen kann eine Konformation mit verdrehten Aromaten begünstigt werden oder ein Verdrehen ist sterisch ungünstig und die Aromaten liegen relativ plan zueinander.

Die Ladungsverteilung der NHC-Au(I)-Alkine entspricht mit einem negativen Teil am Alkin der der Phosphan-Au(I)-Alkine. Die NHCs weisen im Vergleich zu den Phosphanen jedoch eine stärker positive Elektronenwolke auf. Dies passt ebenfalls zu den höheren Dipolmomenten der NHC-Au(I)-Alkine. Schaut man diese an, sollten Komplexe 29 und 30 mit den höchsten Dipolmomenten die aktivsten Substanzen darstellen. Im Gegensatz dazu besitzt Komplex 28 das geringste Dipolmoment und sollte eine geringe Reaktivität zeigen. Eine Erhöhung der Elektronendichte auf Alkinseite und deren Minimierung auf der NHC-Seite scheint also die Reaktivität der Komplexe zu erhöhen.

Die BDE passen hier ebenfalls zu den vorherigen Werten. Die Komplexe mit großem Dipolmoment zeigen gleichzeitig eine gewisse Stabilität der Goldbindungen. Ethylgruppen scheinen die NHC-Au(I)-Bindung zu stabilisieren und der Ligandeneinfluss der 5-Position ist ähnlich. Die Bindungen von NHC zu Gold(I) sind zudem stabiler als die der Phosphane und die Alkine scheinen etwas stärker an das Goldzentralatom zu binden als ihre NHC-Partner.

Zusammenfassend können somit für die NHC-Au(I)-Alkine folgende Schlüsse aus den Berechnungen gezogen werden:

- Die Aromatenebenen verdrehen sich mit einem Maximalwert von 49 ° zueinander. Der Winkel ist von den Alkylresten und NHC-Liganden abhängig, die getesteten Alkine zeigen hingegen keinen relevanten Einfluss darauf
- NHC- und Alkinliganden haben ähnliche Bindungslängen zum Zentralatom

- Der NHC-Ligand beeinflusst die Parameter der Komplexe insgesamt stärker als der Alkinligand
- Der Alkinligand scheint stabiler an das Goldzentralatom zu binden als der NHC-Ligand
- Eine Ethylierung der NHC-Stickstoffe führt zu stabileren und kürzeren Gold-NHC-Bindungen als ihre methylierten Partner und die Aromatenebenen sind stärker gegeneinander verdreht
- Die NHC-Au(I)-Alkine besitzen eine negative Ladungsdichte auf der Alkinseite und weisen höhere Reaktivität auf, je stärker die Polarisierung durch ihre Liganden ausfällt (z.B. Methoxy-NHC und Fluor-Alkin, Komplex 30)

Die Bindungsdissoziationsenergien überraschen während der Auswertung der berechneten Daten, da zu erwarten war, dass das NHC stärker an das Gold gebunden vorliegt. Die Verhältnisse der Spaltprodukte der Massenspektrometrie deuten ebenfalls auf stabilere NHC-Au-Fragmente hin. Da die Untersuchung der Fluor- und Goldgehalte im Vergleich nicht funktioniert hat (Kapitel 5.4), kann anhand der gemessenen Daten keine weitere Aussage hierzu getroffen werden. Der Vergleich der errechneten Reaktivitäten mit den in der Zellkultur ermittelten Daten erfolgt im Zusammenhang mit der Diskussion der biologischen Daten auf den folgenden Seiten.

Die biologischen Ergebnisse für die NHC-Au(I)-Alkine sind von großem Interesse. Die Substanzklasse steht in direktem Vergleich zu den NHC-Au(I)-Phosphanen und Phosphan-Au(I)-Alkinen. Gleichzeitig müssen die Testverfahren für die Substanzklasse erst erschlossen, und damit die Frage geklärt werden, welche Methoden durchführbar sind.

Komplex 23 wird für die neuen biologischen Versuche als Stellvertreter gewählt, da er je ein aktives NHC und Alkin kombiniert und schon in der Syntheseentwicklung als Prototyp erfolgreich verwendet wurde.

Die in Kapitel 5 beschriebenen Untersuchungen können mit Komplex 23 oder mehreren Vertretern der neuen Substanzklasse erfolgreich durchgeführt werden. Die Komplexe zeigen nur bei großen Resten an 5-Position wie dem Carbonsäureester oder Mestranol Löslichkeitsprobleme, die aber noch akzeptabel sind. Das ist für biologische Versuche von großem Vorteil, da meistens wässrige Systeme die Grundlage für diese bilden. Hier sind die

NHC-Au(I)-Alkine anderen Komplexen, die zum Beispiel das Triphenylphosphan tragen, deutlich überlegen.

Ein Versuch lässt sich für die NHC-Au(I)-Alkine jedoch nicht auswerten. Bei der Untersuchung der Fluorzellaufnahme lassen sich keine Gehalte ermitteln. Dies liegt, wie in Kapitel 5.4 erläutert wird, wahrscheinlich daran, dass das Fluor aus den NHC-Au(I)-Alkinen nicht in GaF überführt werden kann. Da NHC-Au(I)-Chloride mit dieser Methode vermessen werden können, deutet dieses Ergebnis aber darauf hin, dass die neuen Komplexe als Ganzes in die Zelle gelangen oder innerhalb der Zelle einer anderen Verstoffwechslung oder Reaktion unterliegen als ihre Vorstufen. Eine weitere Aussage erlaubt der Versuch nicht.

Betrachtet man die gesammelten biologischen Daten für die NHC-Au(I)-Alkine, können diese als neue potentielle Wirkstoffklasse eingestuft werden. Interessant ist, dass nicht alle getesteten Komplexe ähnliche Ergebnisse aufweisen, sondern deutliche Unterschiede in den Aktivitäten beobachtet werden können. Natürlich sind viele aktive Komplexe ein angestrebtes Ziel einer solchen Testreihe, aber durch die unterschiedlichen Aktivitäten können Strukturwirkungsbeziehungen zielgerichteter abgeleitet werden, als wenn alle Komplexe gleich aktiv wären.

Da während der Zeit am Institut nicht alle Komplexe in ausreichender Menge oder Reinheit synthetisiert werden konnten, fehlen die Ergebnisse der Zytotoxizitätstests zum Beispiel für

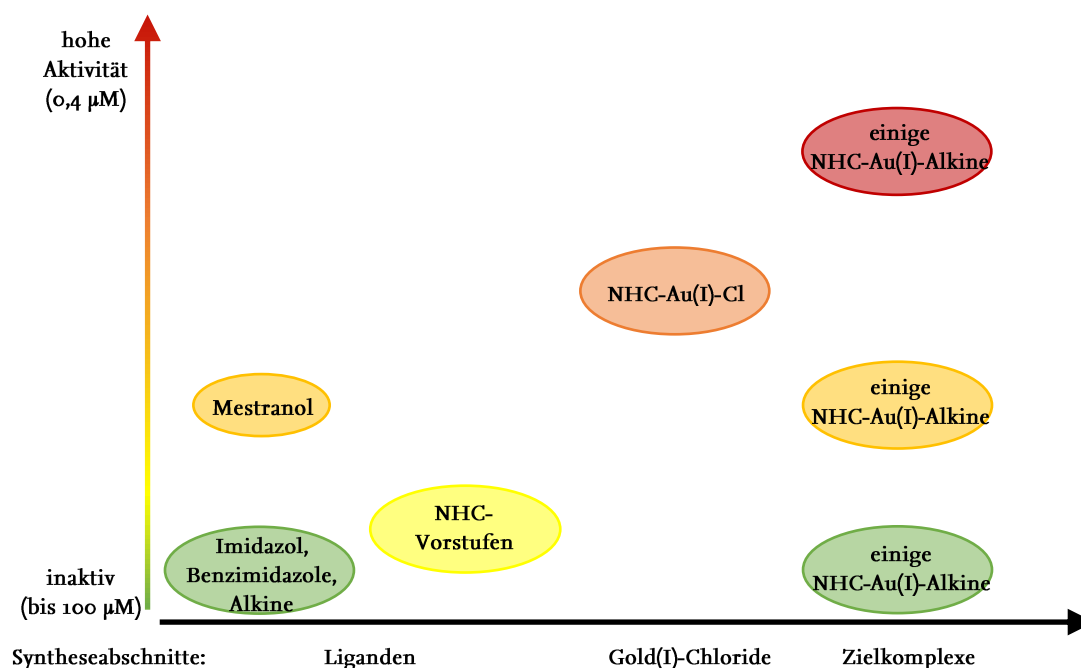


Abbildung 76 Schematische Aktivitätsübersicht der NHC-Au(I)-Alkine und ihrer Vorstufen

Komplex **34**. Trotzdem lassen sich aus den ermittelten Daten wichtige Schlüsse für die neue Substanzklasse ziehen.

Abbildung 76 zeigt eine schematische Übersicht über die Aktivität der Ausgangssubstanzen, Vorstufen und Zielkomplexe gegenüber den getesteten Zellen. Bis auf Mestranol und die in Kapitel 5.1 erwähnte Ausnahme für RC-124-Zellen sind die metallfreien Ausgangssubstanzen und Vorstufen inaktiv gegenüber allen getesteten Zelllinien. Wird die Kopplung zum NHC-Au(I)-Cl durchgeführt, ist eine Aktivität zwischen 2 und 25 μM messbar. Dieses Ergebnis passt zu früheren Daten aus dem Arbeitskreis. Alle getesteten NHC-Au(I)-Cl weisen eine Inhibierung des Zellwachstums auf.

Nach dem Ligandenaustausch zum NHC-Au(I)-Alkin verlieren die Benzimidazolkomplexe mit Carbonsäureesterrest (**26** und **27**) ihre Aktivität fast komplett. Dieser NHC-Rest unterscheidet sich von den anderen durch seinen negativen Mesomerieeffekt. Eine solche Veränderung scheint sich somit negativ auf die Aktivität der NHC-Au(I)-Alkine auszuwirken. Beide Imidazolkomplexe (**20** und **21**) weisen inhibitorische Effekte ca. um 10 μM höher als ihre jeweiligen Vorstufen auf. Ähnlich ist es bei dem fluorierten Benzimidazolkomplex (**28**), dessen IC_{50} -Werte sich ebenfalls um ca. 10 μM erhöhen. Das unsubstituierte Benzimidazol hat als Alkincomplex nur noch in ethylierter Form (**23**) eine gute bzw. gesteigerte antiproliferative Wirkung, während der methylierte Partner (**22**) seine Aktivität fast komplett verliert. Das 5-Methoxybenzimidazol zeigt für beide Komplexformen (**24** und **25**) eine gesteigerte Aktivität. Betrachtet man zusätzliche die weiteren Serien der NHC-Au(I)-Alkine, bleibt diese Tendenz weiter erhalten. Die 5-Methoxybenzimidazolkomplexe zeigen mit allen Alkinen jeweils die höchste Aktivität, während die weiteren Benzimidazol- und 5-Fluorbenzimidazolkomplexe einen gewissen Verlust der Aktivität im Vergleich zu der NHC-Au(I)-Cl-Vorstufe aufweisen. Der positive Mesomerieeffekt der Methoxy-Reste kombiniert mit dem induktiven Effekt der Gruppe scheint einen guten Einfluss auf die Aktivität zu haben. Dies ist bei den anderen NHCs nicht so ausgeprägt. Im Überblick lässt sich ebenfalls erkennen, dass der NHC-Ligand die antiproliferativen Effekte weitaus stärker beeinflusst als die Alkinliganden.

Vergleicht man Serie 1 untereinander im Hinblick auf die Stickstoffsubstituenten, ist gut zu erkennen, dass die ethylierte Komplexform eine höhere Inhibition auf das Zellwachstum ausübt als die methylierte. Komplex **23** und alle 5-Methoxybenzimidazol-Varianten (**24**, **25**, **30** und **33**)

sind zusammenfassend die aktivsten Substanzen unter den getesteten NHC-Au(I)-Alkinen. Der induktive Effekt steigt mit der Kettenlänge, zusammen mit der Goldabschirmung könnte das die höhere Aktivität erklären.

Insgesamt kann man für alle Komplexe erkennen, dass sie auf die Kolonkarzinomzellen HT-29 einen minimal geringeren antiproliferativen Effekt ausüben als auf die beiden Brustkrebslinien MCF-7 und MDA-MB-231. Bezieht man für diese Beobachtung die Zellaufnahmestudie (Kapitel 5.4) mit ein, könnte die Erklärung in der längeren Inkubationszeit der HT-29-Zellen und der schnellen Aufnahme und Wiederausschleusung der NHC-Au(I)-Alkine liegen. Die Kolonkarzinomzellen haben durch die längere Inkubationszeit die Möglichkeit sich zu regenerieren. Um einen eindeutigen Vergleich zwischen den Zelllinien zu haben, müsste der Versuch für alle Zelllinien unter gleichen Bedingungen durchgeführt werden. Das wäre am einfachsten umsetzbar, wenn die Zellzahl bei der Aussaat so angepasst wird, dass alle Zelllinien nach der gleichen Inkubationszeit gestoppt werden können. Ein Blick auf die Ergebnisse für die RC-124-Zellen zeigt, dass eine Selektivität gegenüber den Krebszellen im Vergleich zu den Nierenzellen nicht erkennbar ist.

Vergleicht man nun die ermittelten Aktivitäten (Kapitel 5.1) mit den berechneten Daten (Kapitel 3) wird deutlich, dass die Tendenz beider Ergebnisse gut zueinander passt.

Die Aktivität der Komplexe scheint mit dem Verdrehungsgrad der Aromaten zuzunehmen. Die ethylierten Komplexe zeigen eine größere Verdrehung und eine höhere Aktivität gegen Krebszellen. Die Bindungslängen variieren nur geringfügig, die Tendenz passt aber zu den gemessenen Daten genauso wie die Reaktivitäten aus den Dipolmomenten. Das 5-Methoxybenzimidazol stellt dabei das aktivste NHC dar. Die große negative Ladung durch den Fluorrest auf NHC-Seite wiederum bringt nicht die inaktivsten Substanzen hervor, worauf die Berechnungen hindeuten. Die Carbonsäureester stellen gemessen und berechnet eher inaktive Vertreter der NHC-Au(I)-Alkine dar, Imidazol und Benzimidazol befinden sich im Mittelfeld. Dass die ethylierten Formen der Komplexe aktiver sind als ihre methylierten Partner, könnte in der berechneten höheren Stabilität der ethylierten Komplexe begründet liegen. Eine Reaktivität ist essentiell, aber die stabilisierenden Effekte der Reste schützen vor zu schneller Reaktion z.B. bereits im Medium. Extrem reaktive Komplexe könnten zu schnell reagieren und ihre Zielstrukturen gar nicht erreichen, eine gewisse Stabilität ist somit vorteilhaft.

Drei der Kernaussagen stimmen somit für die gemessenen und berechneten Daten überein. Das 5-Methoxybenzimidazol stellt die aktivsten Komplexe, der NHC-Ligand hat deutlich größeren Einfluss auf die Eigenschaften der Komplexe als das Alkin und die ethylierten Komplexe weisen eine höhere wachstumshemmende Wirkung.

Dass nicht alle Schlüsse, die anhand der errechneten Daten gezogen wurden, mit den gemessenen antiproliferativen Effekten übereinstimmen, war zu erwarten. Nicht jede chemische Eigenschaft prägt sich auch in der biologischen Aktivität aus, aber die große Schnittfläche ist positiv zu bewerten. Man kann zusammenfassend sagen, dass trotz kleiner Abweichungen zwischen Berechnung und Messung durch das Screening mittels DFT-Kalkulation für die NHC-Au(I)-Alkine hilfreiche Daten gewonnen werden konnten.

Die NHC-Au(I)-Alkine wurden nicht nur auf ihre antiproliferativen Effekte untersucht. Wie bereits erwähnt sind mit Komplex 23 als Prototyp verschiedene Untersuchungen durchgeführt worden, um mögliche Testverfahren zu erschließen und erste Daten zu sammeln.

Komplex 23 hemmt, wie aus den Zytotoxizitätsdaten (Kapitel 5.1) und den Ergebnissen der morphologischen Untersuchungen (Kapitel 5.2) hervorgeht, nicht nur die Zellteilung und das Wachstum der HT-29-Zellen. Die Adhäsionsfähigkeit der Zellen geht verloren, die Zellen verfallen in eine Kugelform und der Stoffwechsel scheint heruntergefahren. Dies sind Hinweise auf eine mögliche Apoptose der Zellen. Somit hätten die NHC-Au(I)-Alkine nicht nur einen zytostatischen, sondern auch einen zytotoxischen Effekt. Um dies jedoch zu bestätigen, sind weitere Untersuchungen nötig (siehe Kapitel 7.2).

Die Interaktion mit FCS und BSA (Kapitel 5.3) ist ein guter Vorversuch für die Zellaufnahmestudien (Kapitel 5.4) und gibt Hinweise auf die Interaktion mit zum Beispiel Transportproteinen im Blut.

Komplex 23 zeigt eine vollständige Bindung an das Proteingemisch FCS, weshalb weitere Untersuchungen an dem ubiquitären Transportprotein Albumin durchgeführt wurden. Die Affinität zu BSA ist ebenfalls relativ hoch, sie beträgt im Schnitt für alle getesteten Komplexe 90 %. Mit Ausnahme von Komplex 27, der trotz hoher BSA-Bindung im Zytotoxizitätstest inaktiv ist, zeigen alle anderen Komplexe mit einem niedrigen IC_{50} -Wert eine hohe BSA-Bindung.

Dies erscheint zuerst passend. Das BSA könnte die Komplexe in die Zellen schleusen, wo sie dann ihre Aktivität zeigen. Dem widerspricht jedoch einer der Zellaufnahmeversuche mit Komplex 23.

Die Zellaufnahme wurde mit verschiedenen Komplexen, Konzentrationen und Inkubationszeiten durchgeführt. Zusätzlich wurde sie für Komplex 23 mit und ohne FCS untersucht. Dieser Versuch deutet darauf hin, dass FCS die Zellaufnahme reduziert. Das heißt: Komplexe, die sehr gut an FCS bzw. BSA binden, gelangen in geringerem Maße in die Zielzelle. Eine geringere Konzentration in der Zielzelle kann mit einer geringeren Aktivität einhergehen. Folglich sollte ein Komplex, der sehr gut an BSA bindet, eine kleinere Zellaufnahme aufweisen und dadurch auch einen höheren IC_{50} -Wert. Die verschiedenen Erklärungsansätze hierzu wurden in Kapitel 5.4 bereits erläutert.

Basierend auf den gesammelten Daten der Zellaufnahmestudien können mehrere Kernaussagen formuliert werden:

- Die Zellaufnahme ist konzentrationsabhängig.
- Die maximale Aufnahme erfolgt innerhalb einer Stunde und der Goldgehalt nimmt mit der Zeit wieder ab.
- FCS verringert für Komplex 23 die Zellaufnahme.
- Für Serien 1 lässt sich eine Korrelation zwischen Zellaufnahme und antiproliferativem Effekt erkennen.
- Serie 2 zeigt, dass das Einführen eines Fluoratoms die Zellaufnahme erhöht, die antiproliferativen Effekte steigen aber nicht gleichzeitig.

Betrachtet man noch abschließend die als Target identifizierte TrxR, wird diese von den NHC-Au(I)-Alkinen im nanomolaren Bereich inhibiert. Die IC_{50} -Werte liegen dabei ungefähr im gleichen Bereich wie die der Referenzen. Die kleineren Vertreter der NHC-Au(I)-Alkine inhibieren die TrxR deutlich besser als längere Komplexe. Bleibt 5-Position des NHCs unsubstituiert, ist die Inhibition ebenfalls stärker. Dies deutet darauf hin, dass die Größe der NHC-Au(I)-Alkine ein ausschlaggebender Punkt in der Inhibition der TrxR ist. Eine Korrelation

zwischen TrxR-Inhibition und Zytotoxizität lässt sich zudem nicht erkennen. Wahrscheinlich ist die Thioredoxinreduktase deshalb nicht das einzige Target der NHC-Au(I)-Alkine.

Um einen weiteren Blick auf das schon oft untersuchte Enzym zu werfen, wird der Inhibitionstest aus dem Zytosol entwickelt und durchgeführt. Hiermit kann man wie erläutert nicht spezifisch die TrxR-Inhibition messen, sondern betrachtet den Haushalt der disulfidspaltenden Enzyme und ob diese in ihrer Gesamtheit inaktiviert werden. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, dass die Komplexe die Gesamtaktivität reduzieren und somit den Zellen einen deutlichen Teil der Stressabwehrprozesse nehmen. Ob dies nur an der Inhibition der TrxR liegt oder auch andere Enzyme wie die Glutathionreduktase betroffen sind, bedarf einer weiteren Untersuchung des Prozesses (siehe Kapitel 5.5). Der erhöhte intrazelluläre Stress kann zur Einleitung der Apoptose führen, worin die Aktivität der NHC-Au(I)-Alkine begründet liegen kann.

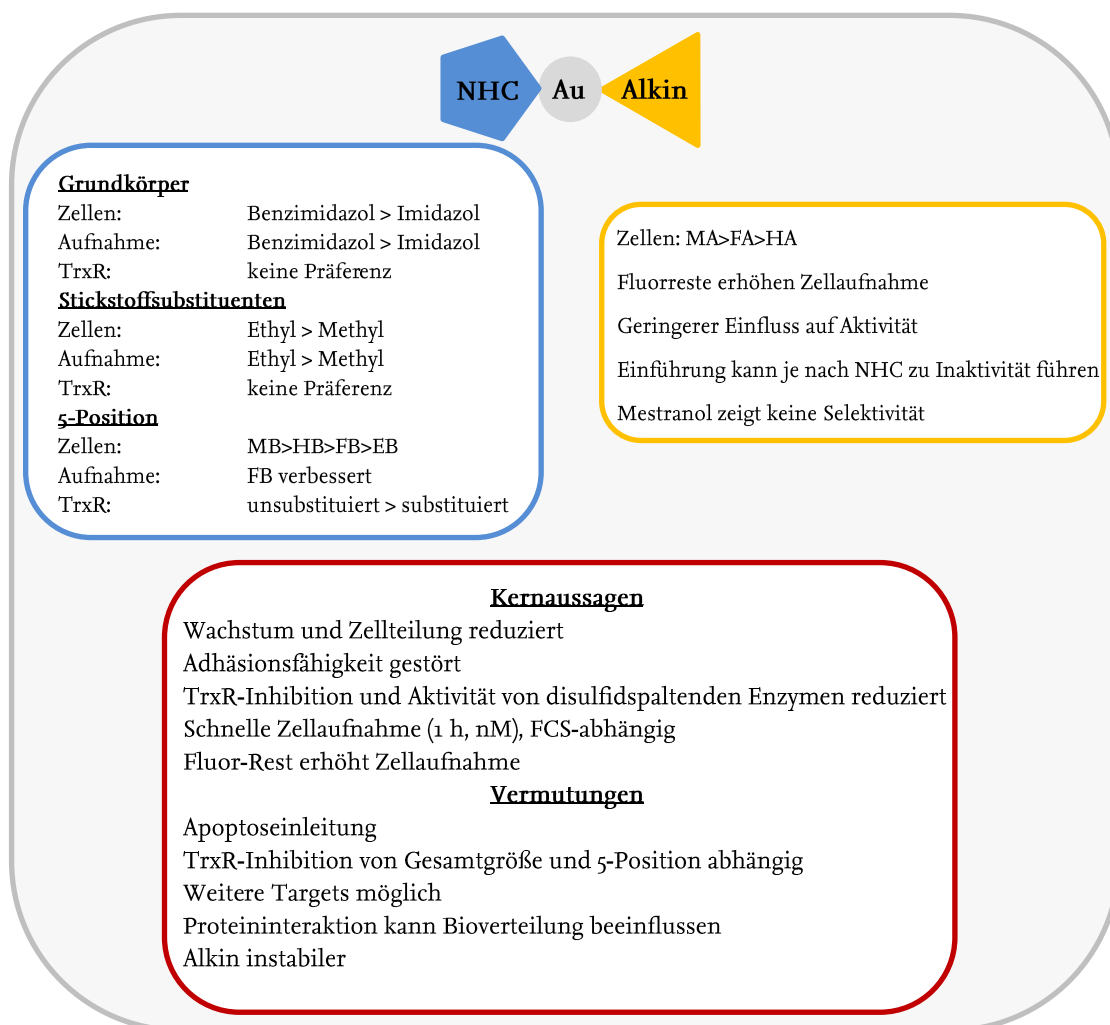


Abbildung 77 Ergebniszusammenfassung

Die NHC-Au(I)-Alkine konnten somit erfolgreich synthetisiert werden und zeigen im ersten biologischen Screening vielversprechende Ergebnisse. Die Daten sind komplex, deshalb werden sie in Abbildung 77 veranschaulicht.

Wie in Kapitel 5 bereits an verschiedenen Stellen erwähnt, unterliegen biologische Analysen einer hohen Fehlerquote und man erhält oft relative Standardabweichungen von 10 bis 25 %, die für eine analytische Methode sehr hoch sind.

Die meisten Versuche beinhalten mindestens einen Wägeschritt, einen Lösungsvorgang und die dazugehörige Verdünnungsreihe. Komplexe werden mit Zellen oder Reagenzien gemischt und es folgt mindestens eine analytische Messmethode, deren Ergebnisse anhand einer Kalibrierung ermittelt werden. Die genutzten Methoden arbeiten unterschiedlich präzise. Zusätzlich bauen einzelne Versuche nicht selten auf den Ergebnissen eines vorangegangenen Tests auf. Beinhaltet so eine Versuchsreihe zudem biologische Systeme wie lebendige Zellen, kommt eine zusätzliche Fehlerquelle bzw. Schwankung dazu. Zusätzlich addieren sich der menschliche und zufällige Fehler zu den systematischen Fehlern der Methoden. Der menschliche Fehler hängt von der durchführenden Person und den Fertigkeiten dieser ab. Auf die zufälligen Fehler hat man selten einen Einfluss.

Um das Ausmaß der Fehlerquellen eines realistischen Versuchsaufbaus besser verstehen zu können, werden für die Zellaufnahme von Gold beispielhaft die Schritte aufgelistet, die das Endergebnis beeinflussen (siehe Tabelle 31).

Im Durchschnitt muss man also für ein Ergebnis der Zellaufnahmeuntersuchungen also fünf Mal einwiegen und daraus werden zwei Kalibrierungen hergestellt, die zusätzlich aufeinander aufbauen. Die durchgeführten Lösungsvorgänge, Verdünnungs- und Mischschritte sind an dieser Stelle nicht zählbar, wobei hierfür zusätzlich nicht eine Pipette verwendet werden kann, sondern Ein- und Mehrkanalpipetten mit unterschiedlichen Volumina verwendet werden. Zudem addieren sich die systematischen Fehler des Photometers, der Bradfordmethode und der HR-CS AAS.

Versuch	Schritt	Fehlerquelle
Inkubation	Konfluenz (70 - 90 %) bei Start	Mensch, Zellkultur
	Einwaage Substanz	Waage
	Lösen und Verdünnen	Pipetten
	Kultivierungsdauer, Temperatur, CO ₂ -Gehalt, Spülschritte, Lysierung	Mensch, Inkubator
Proteinbestimmung	Kalibrierungsreihe mit BSA (einwiegen, lösen und verdünnen)	Waage, Pipetten
	Bradfordreagenz (Herstellung und Verdünnung)	Waage, Pipetten
	Mischen von Reagenz und Analyt	Pipetten
	Inkubationszeit	Mensch
	Photometrische Messung (2-fach)	Gerät, Reagenz
Goldbestimmung	Modifier (Herstellung)	Waage, Pipetten
	Kalibrierungsreihe mit Substanz (Einwiegen, Lösen, Verdünnen, Mischen)	Waage, Pipetten
	Verdünnen des Analyten auf 1 mg Protein/ml, Mischen	Pipetten
	AAS-Messung (3-fach)	Gerät, Probe

Tabelle 31 Auflistung der Schritte eines Zellaufnahmeversuchs inklusive Fehlerquellen

Für das genutzte Photometer wird ein Fehler bis 0,5 % angegeben, der Pipettenfehler liegt je nach Volumen zwischen 0,6 bis 8,0 % pro Pipettierschritt. [233–235] Wie erwähnt, kommen noch der zufällige, zellkulturbedingte und menschliche Fehler hinzu. An dieser Stelle wird deutlich, dass die hohen relativen Standardabweichungen von biologischen Versuchen in ihrer Komplexität begründet liegen. Solche Versuche können, was ihre Präzision angeht, nicht mit z.B. einer HPLC-Methode zur Bestimmung eines einzelnen Analyten oder ähnlichem konkurrieren. Den Forschern auf diesem Gebiet ist bewusst, was hinter den Ergebnissen steckt. Trotzdem ist es natürlich Ziel einer jeder Forschergruppe so präzise wie möglich zu arbeiten. Hierfür gibt es bestimmte Techniken, Verhaltensweisen, Reagenzien etc., die dies begünstigen. Finden Arbeiten mit Lebendzellen statt, ist die Pflege der Zelllinien basierend auf ihrem Alter, wie sie in Kapitel 5.1 beschrieben wird, Grundvoraussetzung für vergleichbare Ergebnisse. Zudem gibt es Reagenzien wie das standardisierte FCS, das weniger anfällig für Chargenunterschiede ist und somit ein einheitliches Wachstum hervorbringt. Klare *Standard Operation Procedures* (SOPs) und Einweisung der durchführenden Personen sind zudem essentiell, um individuelle Fehler zu minimieren. Methoden sollten so simpel wie möglich

gehalten und einzelne Schritte so angepasst werden, dass der Fehler so klein wie möglich ist. Verdünnungsreihen sind hierfür ein gutes Beispiel.

Zu Anfang der Arbeit wurden diese im Labor in einer Reihenverdünnung hergestellt. Hierbei wird eine Verdünnungsreihe durch fortgesetztes Verdünnen erstellt, dabei wird aus der jeweils höheren Konzentration die kleinere hergestellt. Der Pipettenfehler addiert sich somit bis zur kleinsten Konzentration weiter auf. [236] Diese Methode wurde durch eine Mischung aus Reihen- und Punktverdünnung ersetzt, sodass sich die Fehlerfortpflanzung reduziert. Bei der Punktverdünnung werden kleine Konzentrationen immer aus der gleichen Stammlösung hergestellt und die Aufsummierung des Pipettenfehlers verhindert.

Bei solchen Verdünnungen sind die Fähigkeiten der durchführenden Personen extrem wichtig und ein gutes Beispiel für individuelle und menschliche Fehler. Der Umgang mit Pipetten, die Volumina unter einem Mikroliter abmessen, ist eine häufige Fehlerquelle bei der Arbeit in sehr kleinen Konzentrationsbereichen. Der durchführenden Person muss klar sein, dass eine Pipettenspitze, die solch kleine Volumina aufnimmt, nicht in die zu pipettierende Lösung getaucht werden kann, sondern die Flüssigkeit nur an der Grenzfläche aufgenommen wird. Dies erscheint banal, aber bei einem Volumen von $0,5\ \mu\text{l}$ bleibt beim vollkommenen Eintauchen einer Pipettenspitze in eine Lösung so viel Flüssigkeit an der Außenwand haften, dass die hergestellte Lösung eine deutliche Konzentrationsschwankung aufweist.

Kritische Messdaten sollten zudem immer einer Mehrfachbestimmung unterzogen werden. Dies wird zum Beispiel in dieser Arbeit mit der Sechsfachbestimmung während des Antiproliferationstests, der Zweifachbestimmung der Bradfordmessung oder der Dreifachmessung am Atomabsorptionsspektrometer umgesetzt. Zudem gilt die klare Regel: Ein Wert ist kein Wert. Unabhängige Mehrfachbestimmungen eines Endergebnisses sind deshalb Pflicht, auch wenn das mit viel Zeit, Material und Arbeitsaufwand einhergeht. Das Material, mit dem man arbeitet, sollte wie die Zelllinien gepflegt und gewartet werden. Hierunter fallen vor allem Waagen, Pipetten, Werkbänke für sterile Arbeiten und alle analytischen Geräte. Richtlinien wie GMP (*good manufacturing practice*), GLP (*good laboratory practice*) und GSP (*good scientific practice*) sind für eine Vereinheitlichung von Methoden weltweit und die Wahrnehmung unter den Forschergruppen dabei sinnvolle Vorgaben. [237]

Was bedeuten die erklärten hohen relativen Standardabweichungen nun für biologische Daten, wie sie in dieser Arbeit gesammelt wurden? Unter gleichen Bedingungen sind auch in

verschiedenen Laboratorien gemessene Werte gut vergleichbar. Werden sehr kleine Konzentrationen für z.B. einen IC_{50} -Wert ermittelt, sollte man jedoch vorsichtig mit Aussagen zu besserer oder schlechterer Aktivität sein. Je kleiner der IC_{50} -Wert ist, desto stärker äußert sich der gesamte Fehler dieses Ergebnisses. Der Vergleich von einzelnen Werten ist zwar immer noch möglich, aber man sollte besser von Aktivitätsbereichen sprechen. Genauso verhält es sich bei Enzymaktivitäten oder der Zellaufnahme der Metalle. Ergebnisse, die aus so vielen Schritten, wie oben beschrieben, gewonnen werden, können niemals so präzise ausfallen, wie die letzte durchgeführte Messmethode, selbst wenn diese sehr kleine Quantifizierungs- bzw. Nachweisgrenzen besitzt. Je nach Versuch erreicht man mit Konzentrationen im einstelligen μM bis nM diese Grenze, sodass keine eindeutigen Unterschiede zwischen den einzelnen Komplexen zu erkennen sind und, wie bereits erwähnt, besser von Aktivitätsbereichen gesprochen werden sollte.

Die Versuche der Löslichkeitsvermittlung mittels Lipidnanocarriern liefern viele neue Ergebnisse, die für zukünftige Forschungsreihen hilfreich sein werden. Hervorzuheben ist die Tatsache, dass potentielle Wirkstoffkandidaten in Nanoemulsionen eingebracht werden können und dadurch biologische Versuche durchführbar werden. Es gibt mittlerweile eine Vielzahl von Veröffentlichungen, die bereits zugelassene Wirkstoffe mittels Lösungsvermittlung weiter untersuchen. Ein Screening in so früher Forschungsphase kann dazu führen, dass Wirkstoffkandidaten mit hohen Löslichkeitsproblemen nicht aus dem Pool potentieller Wirkstoffe herausfallen. Die Versuchsreihe ist zwar aufwändig, aber mit einer gewissen Routine und klaren Vorschriften trotzdem gut umsetzbar. Es darf auch nicht vergessen werden, dass die SynFobiA-Gruppe solche Pilotprojekte als Chance nutzen sollte, interdisziplinär Kooperationen aufzubauen und das Knowhow der verschiedenen Forschungsgruppen auszuschöpfen. Genau das ist in diesem Projekt geschehen.

Zusätzlich zu der erfolgreichen Zusammenarbeit werden für verschiedene Fragestellungen Daten gesammelt. Das Lösen der Komplexe kann definitiv weiter optimiert werden, um die Verluste zu reduzieren und einen höheren Gehalt zu erreichen. Es könnten weitere Messmethoden erprobt werden, um den Gehalt der gelösten Komplexe zu bestimmen, da die HR-CS AAS hier ein aufwändiges Verfahren und die Veraschung für die Lipidproben nicht optimal ist. Zusätzlich könnten Stabilitätsstudien helfen, die Haltbarkeit so einer beladenen

Nanoemulsion abzuschätzen. Dies ist mittels HR-CS AAS nicht möglich, da der Zustand der Emulsion sowie der Komplexe keinen Einfluss auf den Goldgehalt der Probe haben.

Die Untersuchung der Nanoemulsionen auf die genutzten Zelllinie zeigte überraschend, dass die Zellen im Wachstum gestört werden. Dies könnte weiter betrachtet werden und evtl. ist eine Anpassung des Versuchsaufbaus ausreichend, um die Effekte zu reduzieren. Wenn eine ausreichende Beladung der Nanoemulsion stattfindet, wird die benötigte Menge der Nanoemulsion reduziert und die Effekte auf die Zelllinien können vernachlässigt werden. Die unbeladenen Nanoemulsionen sind nämlich in sehr hohen Konzentrationen getestet worden, die in den späteren Versuchen bei ausreichender Beladung nicht nötig waren.

Da in den Probeläufen teilweise geringe Beladungen erzielt wurden oder während der Versuche durch menschliche Fehler Verluste entstanden, war eine Messung der antiproliferativen Effekte nur bis zu einer Konzentration von 1 μM möglich. Hier lässt sich kein wachstumshemmender Effekt erkennen, was aber in der geringen Konzentration begründet liegt. Hier wäre ein erneuter Versuch mit höheren Konzentrationen nötig. Die Zelllinien zeigen aber gegenüber der getesteten Menge der beladenen Nanoemulsion eine gute Toleranz, was bestätigt, dass eine gute Beladung essentiell für alle Folgeversuche ist.

Die Zellaufnahmeuntersuchungen mit beladener Nanoemulsion zeigen eine schnelle Aufnahme in die Zelle und eine Reduktion des Goldgehalts mit der Zeit. Die freien Phosphan-Au(I)-Alkine zeigen eigentlich eine zeitabhängige Akkumulation in der Zelle. Hier wird also durch den Lipidcarrier ein schneller Aufnahmemechanismus begünstigt. Da noch nicht klar ist, wie die Phosphan-Au(I)-Alkine in die Zellen gelangen, kann nur spekuliert werden, ob die Beladung in die Nanoemulsion zu anderen Transportmechanismen führt. Die Aufnahme durch Endozytose und ein Abbau durch Lysosomen sind vorstellbar. Ob und wie die Komplexe in der Zelle aus der Nanoemulsion frei werden, ist zudem nicht geklärt. Die Messung von Löslichkeit und Verteilungsraten könnten an dieser Stelle helfen, das Geschehen besser zu verstehen.

Insgesamt ist die Versuchsreihe trotz einiger Probleme positiv zu bewerten, da erste Daten zu gelösten Goldwirkstoffkandidaten in Lösungsvermittlern gesammelt, die Methoden erprobt und erste Fehlerquellen beseitigt werden konnten. Für die immer größer werdenden Wirkstoffkandidaten ist dies also definitiv eine Möglichkeit, biologische Untersuchungen zu ermöglichen. Die chemische Veränderung ist somit nicht der einzige Weg, eine ausreichende Löslichkeit zu erreichen.

Die Phosphan-Au(I)-Alkine sind zudem erfolgreich chemisch verändert worden. Die neuen Komplexe erfüllen die Ziele, aktive und besser lösliche Vertreter der Komplexklasse zu sein. Die untersuchten Ligandenkombinationen zeigen keine auffälligen Veränderungen der Aktivitäten im Antiproliferations-test. Die TrxR-Inhibition schwankt im nanomolaren Bereich um den Faktor 10, wobei große Liganden eine schlechtere Aktivität zeigen.

Innerhalb eines Klassenvergleichs sind die Phosphan-Au(I)-Alkine und Phosphan-Au(I)-NHCs jeweils relativ homogen, wohingegen die NHC-Au(I)-Alkine untereinander deutliche Aktivitätsunterschiede aufweisen.

7.2 Ausblick

Mit Blick auf die Synthese ist eine Steigerung der Ausbeuten sicherlich möglich, wenn die einzelnen Reagenzien und Zeiten noch stärker an die Liganden angepasst werden. Es wäre ebenfalls möglich, weitere Lösemittel oder Basen auszuprobieren oder auch die Reaktion anstelle mit Wärmezufuhr mittels Mikrowellen einzuleiten. Da für fast alle Komplexe ausreichende Ausbeuten und annehmbare Reinheit erreicht werden, stellt sich hier die Frage, wieviel Energie innerhalb eines Folgeprojekts verwendet werden soll. Verglichen mit der früheren Herstellungs- und Aufreinigungsweise ist die beschriebene Synthesemethode für NHCs sowie Phosphane gut anwendbar, was eine deutliche Vereinfachung der praktischen Arbeit darstellt.

Metallkomplexe allgemein stellen bei vielen analytischen Methoden noch Spezialfälle dar. Die Ermittlung der besten Ionisierungsmethode für die Massenspektrometrie wäre hilfreich, um die neue Komplexklasse vergleichbar und leichter analysierbar zu machen. Standardmethoden wie die HPLC zur Identifizierung von Syntheseprodukten sind zwar für einige Metallkomplexe bereits vorhanden, aber die NHC-Au(I)-Alkine sind in diesem Bereich noch relativ unbekannt. Die Entwicklung einer Messmethode würde zum Beispiel die Untersuchung der Stabilität ermöglichen, die einfacher ist, als die während der Arbeit geplante Messung von Fluor und Gold mittels HR-CS AAS. Die Komplexe könnten auf ihr Dissoziationsverhalten untersucht und die Stabilität der Komplexe in verschiedenen Lösemitteln und biologischen Systemen könnte ermittelt werden. Dazu würde auch eine pH-abhängige Testreihe passen, die die beobachtete Säurelabilität bestätigen könnte.

Die biologischen Daten zeigen, dass die Substanzklasse Krebszellen in ihrem Wachstum erfolgreich hemmt und mit den schon bekannten NHC-Au(I)-Phosphanen, Phosphan-Au(I)-Alkinen sowie anderen Referenzsubstanzen konkurrieren kann.

Die ersten Versuche zeigen eine zytostatische bis zytotoxische Wirkung auf Krebszellen. Von Interesse wären hier Untersuchungen der Apoptoseeinleitung, um eine klare Aussage über die Effektivität geben zu können. Haben die NHC-Au(I)-Alkine Einfluss auf die Einleitung der Apoptose und wenn ja, an welcher Stelle prägt sich ihre Aktivität aus. Hierzu könnten

Versuchsreihen durchgeführt werden und Daten zur weiteren Targetfindung gesammelt werden.

Die Zellaufnahmeuntersuchungen zeigen, dass das Gold der NHC-Au(I)-Alkine relativ schnell in die Zellen gelangt und mit der Zeit wieder die Zelle verlässt. Interessant wäre in diesem Zusammenhang, ob die NHC-Au(I)-Alkine in bestimmten Zellorganellen vermehrt auftreten. Dies würde auf mögliche Targets hindeuten, so wie zum Beispiel bei vielen geladenen Komplexen die Mitochondrien als Target angesehen werden. Aufnahmestudien in einzelne Zellorganellen sind mittlerweile durch gute Isolationsmöglichkeiten in der Zellkultur mit wenig Aufwand durchführbar.

Wie die NHC-Au(I)-Alkine in die Zelle gelangen, ist zudem überhaupt nicht geklärt. Eine Untersuchung von verschiedenen Transportmechanismen könnte Aufschluss hierüber geben. Die hohe Affinität an BSA könnte auf einen proteinvermittelten Transport hindeuten. Ebenfalls ist von Interesse, ob die neue Komplexklasse von Systemen wie dem PGP-Glykoprotein erfasst wird und dadurch evtl. durch Ausschleusung resistenzempfindlich ist. Die schnelle Aufnahme und der Rückgang des Goldgehalts sind ein Indiz dafür.

Um die Inhibition der TrxR besser zu verstehen, könnte die Inhibition der ubiquitären Glutathionreduktase ermittelt werden. Dies könnte zum einen helfen, die Selektivität der NHC-Au(I)-Alkine für die in Krebszellen überexprimierte TrxR einzuschätzen und gleichzeitig im Hinblick auf die Gesamtheit der disulfidspaltenden Enzyme einen weiteren Hinweis geben, inwieweit die NHC-Au(I)-Alkine die Redoxhomöostase beeinflussen.

Für die Phosphan-Au(I)-Alkine bleiben ähnliche Fragen offen, auch wenn die Komplexklasse genauso wie die NHC-Au(I)-Phosphane schon einer größeren Anzahl an Versuchen unterzogen wurde.

Wie in Kapitel 1.3 bereits erläutert wurde, interagieren Goldkomplexe mit verschiedenen Strukturen der menschlichen Zelle, wobei die Liganden einen wichtigen Einfluss auf den Wirkort haben. Zum aktuellen Zeitpunkt werden verschiedene Strukturen genauer betrachtet. Die TrxR bleibt weiterhin ein wichtiges und immer besser verstandenes Target für die meisten

Goldkomplexe. [110, 238] Eine Interaktion mit Zinkfingerproteinen kann für immer mehr Ligandenkombinationen nachgewiesen werden. Zusätzlich gibt es erste Daten zu Aquaporinen und G-Quadruplex DNS. [73, 110, 239] Für ein NHC-Au(I)-Alkin konnte gezeigt werden, dass es die Apoptose p53-unabhängig einleitet. [240] Diese Erkenntnis ist für das Verständnis des Wirkmechanismus sehr wichtig.

Oberkofler et al. haben mittels NMR-Studien die Stabilität von verschiedenen NHC-Au(I)-Alkinen untersucht und konnten zeigen, dass für ihre Komplexe der Alkinligand als erstes abgespalten wird, wenn ein Thiol zur Reaktion zu Verfügung steht. [110] Wenn das Alkin ligandenunabhängig immer als erstes abgespalten wird, kann man dies für die Entwicklung von Wirkstoffkandidaten nutzen und die Bioverteilung wird leichter abschätzbar.

Die Kombination von bekannten antitumorwirksamen Strukturen und neuen Liganden, die bildgebende analytische Methoden ermöglichen, wird ebenfalls immer wichtiger. NHC-Au(I)-Alkine eignen sich hierfür durch ihre Eigenschaften sehr gut. [73, 238, 241] Dies zeigt, dass die NHC-Au(I)-Alkine zum einen noch genauer auf ihre Aktivität untersucht werden müssen, zum anderen ermöglichen sie durch ihre Lumineszenzeigenschaften die Erschließung neuer Testmethoden.

Neue Veröffentlichungen deuten zudem auf eine antibakterielle Wirkung verschiedener Goldkomplexe hin. Dies erschließt ein komplett neues und extrem wichtiges Einsatzgebiet, das durch immer häufigere Antibiotikaresistenzen äußerst dringlich ist. Eine Reihe NHC-Au(I)-Alkinsterioide wurde zum Beispiel kürzlich auf ihre antibakteriellen Effekte untersucht. [109]

Aus aktuellem Anlass werden viele Wirkstoffkandidaten auf einen möglichen Einsatz als antivirale Mittel untersucht. Einige Goldkomplexe dieser Arbeit wurden deshalb auf ihr Interaktionsvermögen mit spezifischen Coronavirusproteinen untersucht. Dabei konnte ein inhibierender Einfluss auf Spike-ACE2, das an der Virusaufnahme beteiligt ist, und auf PLpro, das eine Protease der Virusreplikation darstellt, nachgewiesen werden. [1]

Dass neue Anwendungsmöglichkeiten für schon bekannte Wirkstoffe oder Wirkstoffklassen erschlossen werden, ist mittlerweile keine Seltenheit und führt oft zu wichtigen neuen Erkenntnissen, die nicht nur auf einen Forschungsbereich eingeschränkt sind.

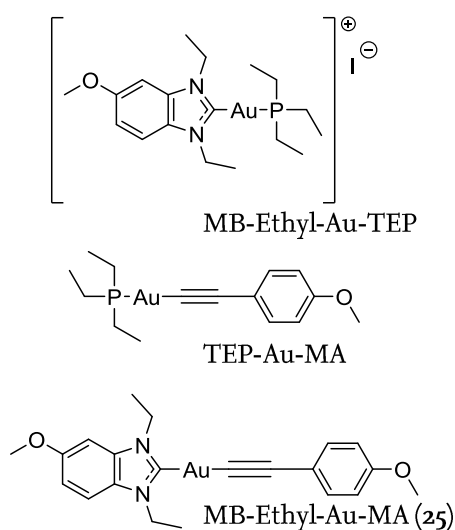


Abbildung 78 Beispiel einer Komplexauswahl für weiterführende Untersuchungen
(MB-Ethyl-Au-TEP, TEP-Au-MA und MB-Ethyl-Au-MA (Komplex 25))

Abschließend wäre meiner Einschätzung nach die Auswahl aktiver Vertreter der drei Substanzklassen sinnvoll, die im Hinblick auf die genaue Zellaufnahme, Stabilität und weitere Targetfindung untersucht wird. Ein Beispiel für solch eine Auswahl findet sich in Abbildung 78. Als Liganden kommen das ethylierte 5-Methoxybenzimidazol, Triethylphosphan und 1-Ethynyl-4-methoxybenzol in Frage. Diese Kombination ist vergleichbar und enthält aktive Vertreter der Komplexklassen, die leicht zu synthetisieren sind und keine Löslichkeitsprobleme bei biologischen Untersuchungen zeigen. Das ethylierte Benzimidzol und Triphenylphosphan sind ebenfalls denkbare Kandidaten.

Aus einem vielfältigen Screening mit wenigen Substanzen kann man zwar keine weiteren Strukturwirkungsbeziehungen ermitteln, aber neue Daten über die Zellaufnahme, Zielstrukturen, Wirkorte, Verstoffwechselung, Resistenzentwicklung und neue mögliche Mechanismen in der Hemmung und Heilung von Krebserkrankungen sammeln.

8 Material und Methoden

8.1 Geräteliste

Die genutzten Geräte unterliegen ausnahmslos den Laborstandards und werden den nötigen Wartungen und Tests unterzogen. Kleingeräte, die dem Laborstandard entsprechen, werden in dieser Liste nicht aufgeführt, alle anderen Geräte werden mit Hersteller und Modell in Tabelle 32 aufgelistet.

Gerät	Modell	Hersteller
Abflambunsenbrenner	Flameboy	Integra Bioscience
Antistatikipistole	Zerostat 3	Milty
Atomabsorptionsspektrometer	HR-CS AAS contrAA 700 mit MPE60	Analytik Jena
Autoklav	LTA 2x3x4	Zirbus Technologies
CO ₂ -Brutschränke	C 170	Binder
	CB 160	Binder
	Heracell 240i	Thermo Scientific
Elementaranalytik (CHN)	Flash ES 1112	Thermo Quest
Fluoreszenz- und Chemolumineszenz-Imaging-System	Fusion FX7	Peqlab
Gelelektrophoresekammer	Mini-Protean® Vertical Gelelektrophoresis	BIO-RAD
Kernresonanzspektrometer	DRX-400 AS	Bruker
	AV III-400	Bruker
	AV II-600	Bruker
Kolbenhubpipetten Einkanal	Research plus 0,5 – 10 µl	Eppendorf
	Research plus 2 – 20 µl	Eppendorf
	Research plus 10 – 100 µl	Eppendorf
	Research plus 20 – 200 µl	Eppendorf
	Research plus 100 – 1000 µl	Eppendorf
	Pipet-lite XLS 0,5 – 10 µl	Ranin
Kolbenhubpipetten Mehrkanal	Research 30 – 300 µl	Eppendorf
	Ultra High-Performance 20 – 200 µl	VWR
	Ergonomic High-Performance 20 – 200 µl	VWR
	Pipet-lite XLS 20 – 200 µl	Ranin
Laminar Air Flow Bench	Herasafe KS 12	Thermo Scientific
	Herasafe KS 15	Thermo Scientific
Massenspektrometer	MAT 95 XL	Thermo/Finnigan
Mikroplatteninkubator	Vortemp 56	Labnet
Mikroplattenlesegerät (UV/VIS)	Victor™ X4	Perkin Elmer
Mikroplattenschüttler	Titramax 1000	Heidolph
Mikroskop	EVOS XL	AMG
	JuLI™ Br	NanoEnTek Inc./Peqlab
Netzteil Elektrophorese/Blot	MP-300V	Cleaver Scientific Ltd

pH-Meter	SevenEasy	Mettler Toledo
Pipette, elektronisch	Accupette	Integra
Rotationsverdampfer	Laborota 4001 efficient + HB digital	Heidolph
Rüttler	PSM3D	Grant-Bio
Schmelzpunktgerät	Electrothermal 9200	Thermo Scientific
Schüttler	Vortex-Genie2	Scientific Industries
Semi-Dry Blotter	Trans-Blot® SD	BIO-RAD
Trockenpistole	Probentrockner PTR 150	Baron
Ultraschallbad	Ultrasonic Cleaner	VWR
Vakuumpumpen	MZ2C NT mit CVC 2 bzw. CVC 24	Vaccubrand
	Trivac D1 mit ADEA 71n4	Leybold und AEG
Vakuumsauger	Vakusafe	Integra Bioscience
Waagen	CPA2250D	Sartorius
	Explorer	Ohaus
	PLE 200-3	Kern
Wasseranlage	arium®	Sartorius
Wasserbad	VWB 12	VWR
Zählkammer	C-Chip (Neubauer Improved Counting Chamber)	Biochrom
Zellmörser/Homogenisator	Dounce Tissue Grinder	Wheaton
Zentrifugen	Compact Star CS4	VWR
	CT15RE HIMAC (T15A62 Rotor)	VWR
	Sprout™	Biozym

Tabelle 32 Geräteliste

8.2 Chemikalien- und Reagenzienliste

Alle Chemikalien, Reagenzien und Lösemittel (Tabelle 33) entsprechen den Laborstandards und stammen, soweit nicht anders erwähnt, von den Firmen Alfa Aesar, Arcros Organic, Carl Roth, Fluka, Merck, Sigma Aldrich und aus dem zentralen Chemikalienlager der TU Braunschweig. Für chemische Zwecke und biologische Untersuchungen wird demineralisiertes Wasser (dH₂O) aus der institutseigenen Anlage verwendet. Für analytische und einige kritische biologische Versuche wird Reinstwasser (rH₂O) aus der arium® Anlage von Sartorius genutzt.

Reagenz	Lieferant und weitere Informationen
Acetonitril	
Aceton	
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	
Aluminiumoxid	
Aluminiumoxid-DC-Platten	N mit Fluoreszenzindikator
Ammoniak	
Ammoniumpersulfat	
Antikörper	Maus anti-human-TrxR1 IgG1, monoklonal (Klon 19A1), Abnova

	Ziege anti-Maus IgG ₁ , polyklonal, HRP-konjugiert, Abnova
	Maus anti-human-Trx IgG ₁ , monoklonal, St John's Laboratory Ltd
1H-Benzimidazol	
Brilliant Blue R concentrate (Coomassie)	
Bovines Serumalbum (BSA)	für Zellkultur
Celite®	
Chlorido(dimethylsulfid)gold(I)	
Chloroform-d (CDCl ₃)	Deutero, für NMR
Clarity™ Wesern ECL substrate	BIO-RAD
Coomassie Brilliant Blau G250	BIO-RAD
1,2-Diamino-4-fluorbenzol	
Dichlormethan	
Diethylenaminoessigsäure (EDTA)	
N,N'-Dimethylformamid (DMF)	für Zellkultur
Dimethylsulfoxid (DMSO)	für Zellkultur
Dimethylsulfoxid-d (DMSO), deuteriert	Deutero, für NMR
Dinatriumhydrogenphosphat	für Zellkultur
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB)	für Zellkultur
Ethanol	
Ethinylnbenzol	
1-Ethynyl-4-fluorbenzol	
1-Ethynyl-4-methoxybenzol	
Ethylacetat (EtOAc)	
Fetales Kälberserum - FBS Superior	Biochrom, für Zellkultur
Gelatine	für Zellkultur
Gentamycin	für Zellkultur
Gibco®-DMEM, high glucose, pyruvat	Life Technologies
Glutaraldehyd	für Zellkultur
Glycerin	für Zellkultur
1H-Imidazol	
Iodoethan	
Iodomethan	
Kaliumcarbonat	
Kaliumchlorid	
Kaliumdihydrogenphosphat	für Zellkultur
Kaliumhydroxid	
Kieselgel	
Kieselgel-DC-Platten	Polygran 254 N/UV, 0,20 nm
Kristallviolett	für Zellkultur
McCoy's 5A (Modified) Medium	Life Technologies
Methanol	
6-Methoxy-1H-Benzimidazol	Maybridge
Methyl-1H-Benzimidazol-5-carboxylat	Maybridge
Milchpulver	für Zellkultur
Natriumchlorid	für Zellkultur
Natriumdodecylsulfat	für Zellkultur
Natriumhydroxid	

Natriumdihydrogenphosphat	für Zellkultur
Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH-Na ₄)	Reduziertes Tetranatriumsalz, C ₂₁ H ₂₆ N ₇ O ₁₇ P ₃ Na ₄ , für Zellkultur
Proteinmarker	Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BIO-RAD
Silberoxid	
Tetrahydrofuran (THF)	
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	
Tetramethylsilan (TMS)	
Thioredoxin	
Thioredoxinreduktase	Sigma-Aldrich, T9698
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	für Zellkultur
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl	für Zellkultur
Triton®-X100	
Trypan-Blue	für Zellkultur
Trypsin-EDTA-Lösung	für Zellkultur
Tween 20	für Zellkultur
Salzsäure (HCl)	

Tabelle 33 Chemikalienliste

8.3 Lösungen, Puffer und Medien

APS-Lösung (10 % m/V)

50 mg APS (Ammoniumpersulfat) werden in 500 µl rH₂O gelöst. Die Lösung muss frisch hergestellt werden (maximal eine Woche haltbar).

Ascorbinsäure (1 % m/V)

0,5 mg Ascorbinsäure werden in 50 µl rH₂O gelöst.

Bradford-Reagenz

250 mg Serva Blue G werden in 250 ml Ethanol (95 % V/V), 500 ml H₃PO₄ (86 % V/V) und 250 ml rH₂O gelöst und gut durchmischt (Lagerung: - 20 °C). Vor Gebrauch wird die Stammlösung an RT angepasst und 1:5 (1 ml plus 4 ml) mit dH₂O verdünnt.

BSA-Lösung (0,2 % m/V, Enzym)

2 mg BSA (bovines Serumalbumin) werden in 1 ml dH₂O gelöst.

BSA-Lösung (1 mg/ml, Bradford)

1 mg BSA wird in 1 ml dH₂O gelöst.

BSA-DMEM-Lösung (40 mg/ml, Proteinbindung)

4,4 g BSA werden in 110 ml DMEM Medium (ohne FCS und Gentamycin) gelöst.

DTNB-Lösung (20 mM)

7,93 mg DTNB werden in 1,0 ml absolutem EtOH gelöst.

EDTA-Lösung (100 mM, pH 7,5)

29,22 mg EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure) werden in 1,0 ml rH₂O gelöst und mit 5 N NaOH auf pH 7,5 eingestellt.

Einfriermedium

Das jeweilige Zellkulturmedium wird mit 10 % DMSO gemischt. Der FCS-Anteil kann bei empfindlichen Zellen als Frostschutz auf 20 % erhöht werden und als DMSO-Alternative kann 10 % Glycerin verwendet werden.

Ethanol (70 % V/V)

70 ml absoluter Ethanol werden mit 30 ml H₂O gemischt.

FCS-Medium-Lösung (Proteinbindung)

10 ml FCS (*fetal calf serum*) werden zu 100 ml DMEM (ohne Gentamycin) gegeben.

Gelatinelösung, steril (1,5 % m/V)

15 g Gelatine werden in 1 l dH₂O angelöst und bei 37 °C verflüssigt. Die Lösung wird im Autoklaven sterilisiert. Die Lagerung erfolgt bei 4 °C.

Gel-Ladepuffer (4x)

2 g SDS, 10 ml Glycerin, 10 ml 1 M Tris (pH 6,8) und 2,5 ml 2-Mercaptoethanol werden gemischt, mit dH₂O auf 25 ml aufgefüllt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Glutaraldehyd-Lösung

20 ml Glutaraldehydlsg. 25 % werden mit 500 ml unsterilem PBS gemischt.

Isopropanol (70 % V/V)

70 ml absoluter Isopropanol werden mit 30 ml dH₂O gemischt.

Kaliumphosphatpuffer (monobasisch, 100 mM, pH 7,0)

6,81 g Kaliumdihydrogenphosphat wird in 500 ml dH₂O gelöst (1 M) und mit HCl bzw. NaOH auf pH-Wert 7,0 eingestellt. Aus dieser Stammlösung werden 10 ml mit 90 ml dH₂O frisch verdünnt, um die Zielkonzentration des Puffers zu erreichen.

Kristallviolettlösung (0,02 % m/V)

0,02 g Kristallviolett werden unter ständigem Rühren in 1 l dH₂O gelöst.

Laufpuffer (10x)

15 g Tris, 72 g Glycin und 0,5 g SDS werden in 500 ml rH₂O gelöst. Vor dem Benutzen 1:10 (10 ml plus 90 ml) mit rH₂O für Laufpuffer 1x verdünnen.

NADPH-Lösung (20 mM)

16,67 mg NADPH-Na₄ (Tetranatriumsalz der reduzierten NADP-Form mit M = 833,4 g/mol) werden in 1,0 ml dH₂O gelöst.

PBS (*phosphate buffered saline*)

Inhaltstoffe werden laut Tabelle 34 eingewogen und in dH₂O gelöst, der pH-Wert wird mit 5 N HCl bzw. 5 N NaOH eingestellt und die Lösung auf das gewollte Volumen aufgefüllt. Für steriles PBS im Autoklaven sterilisieren.

Substanz	1 Liter [g]	5 Liter [g]
NaCl	8	40
Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1	5
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	0,15	0,75
KCl	0,2	1
KH ₂ PO ₄	0,2	1
dH ₂ O	Auffüllen auf 1 l	Auffüllen auf 5 l

Tabelle 34 PBS-Zusammensetzung

Reaktionsmix (RM)

500 µl Kaliumphosphatpuffer (pH 7,0), 80 µl EDTA-Lsg. (20 mM), 20 µl BSA (0,2 % m/V), 100 µl NADPH (20 mM) und 300 µl rH₂O mischen (ergibt 1 ml RM).

Sammelgel (6 %)

Für vier kleine Gele (72 mm x 83 mm x 0,75 mm) werden ca. 10 ml Lösung hergestellt. Dafür werden 6,55 ml rH₂O, 2,0 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg., 1,25 ml 1 M Tris-Puffer (pH 6,8), 100 µl SDS (10 %), 100 µl APS (10 %) und 10 µl TEMED gemischt.

SDS-Lösung (10 %)

50 mg SDS in 500 µl rH₂O lösen. Lösung muss frisch hergestellt werden

TBS (10x)

146,35 g NaCl, 2,12 g Tris und 13 g Tris-HCl werden in 500 ml rH₂O gelöst.

TBST

50 ml TBS (10x), 250 µl Tween20 und 450 ml rH₂O werden gemischt.

Transferpuffer (10 x)

15,14 g Tris und 72,07 g Glycin werden in 500 ml rH₂O gelöst. Vor dem Benutzen muss 1:10 (10 ml plus 90 ml) mit rH₂O für Transferpuffer 1x verdünnt werden.

Trenngel (12 %)

Für größere Proteine wie die Thioredoxinreduktase eignet sich ein geringer konzentriertes Trenngel. Für vier kleine Gele (72 mm x 83 mm x 0,75 mm) werden ca. 10 ml Lösung hergestellt. Hierfür werden 3,35 ml rH₂O, 4,0 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg., 2,5 ml 1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8), 100 µl SDS (10 %), 100 µl APS (10 %) und 4 µl TEMED gemischt.

Trenngel (18 %)

Das höher konzentrierte Gel ist für kleinere Proteine wie das Thioredoxin geeignet. Für vier kleine Gele (72 mm x 83 mm x 0,75 mm) werden ca. 8 ml Lösung hergestellt. Dafür werden 1,05 ml

rH₂O, 4,8 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg., 2,0 ml 1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8), 80 µl SDS (10 %), 80 µl APS (10 %) und 8 µl TEMED gemischt.

Tris-Lsg. (1 M, Sammelgelpuffer)

60,57 g Tris werden in 500 ml rH₂O gelöst und auf pH 6,8 eingestellt.

Tris-Lsg. (1,5 M, Trenngelpuffer)

90,85 g Tris werden in 500 ml rH₂O gelöst und auf pH 8,8 eingestellt.

Triton®-x100-Lsg. (1 % V/V)

1 ml Triton®-x100 wird mit rH₂O auf 100 ml verdünnt.

Trypsin-Lösung (0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA)

Trypsin 0,25 % (enthält 0,1 % EDTA) wird unter aseptischen Bedingungen mit sterilem PBS 1:5 (1 ml plus 4 ml) verdünnt.

Zellkulturmedium

500 ml DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, 4,5 g/l D-Glucose, L-Glutamin, Pyruvat) bzw. *McCoy's 5A Medium* (L-Glutamin) werden mit 50 mg/l Gentamycin und 10 % (V/V) *FCS Superior* unter aseptischen Bedingungen vermischt.

8.4 Humane Zelllinien

Die Zelllinien stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) des Leibniz-Instituts und aus dem *Cell Line Service* (CLS). Die vier Zelllinien sind alle humanen Ursprungs. Drei stellen tumoröses Gewebe dar und eine nicht-tumoröse Zelllinie dient als Referenz. HT-29-Zellen [242] stammen von einem Kolonkarzinom, MCF-7 [123] und MDA-MD-231-Zellen [122] stellen Brustkarzinome dar und RC-124-Zellen [243] stammen aus Nierengewebe. Die Merkmale der Zelllinien sind in Tabelle 35 beschrieben.

Zelllinie	HT-29	MCF-7	MDA-MB-231	RC-124
Art	kolorektales Adenokarzinom	Brust-adenokarzinom	Brustdrüsen-adenokarzinom	primäre Nierenzellen
Spezies	Homo Sapiens	Homo sapiens	Homo sapiens	Homo sapiens
Ethnizität	kaukasisch	kaukasisch	kaukasisch	kaukasisch
Geschlecht	weiblich	weiblich	weiblich	männlich
Alter	44	69	51	63
Morphologie	Epithel	Epithel ähnlich	Epithel	Epithel
Wachstum	adhärenter Monolayer	adhärenter Monolayer	adhärenter Monolayer	adhärenter Monolayer
Besonderheit	hohe Teilungsrate	östrogen-abhängig	hormon-unabhängig, hohe Migrationsneigung	Gelatine-beschichtung
Verw. Medium	DMEM	DMEM	DMEM	McCoy's 5A Medium
Zellzahl für Zytotoxizitätstest	2500 Zellen/ml	4000 Zellen/ml	4700 Zellen/ml	1400 Zellen/ml

Tabelle 35 Für biologische Versuche genutzte Humane Zelllinien und ihre Merkmale

8.5 Synthesevorschriften und Substanzcharakterisierung

Im Folgenden werden die Synthesebedingungen sowie die Substanzcharakterisierung dargestellt. Erklärungen zu den Abläufen und Mechanismen finden sich in Kapitel 4. In Abbildung 79 ist der komplette Syntheseweg für die verschiedenen Komplexe als Übersicht gezeigt. Das folgende Kapitel ist nach den einzelnen Syntheseschritten (a - e) gegliedert. Substanzen, die bereits bekannt sind und deren Synthese nicht angepasst wird, werden nicht zwingend einer kompletten Charakterisierung unterzogen.

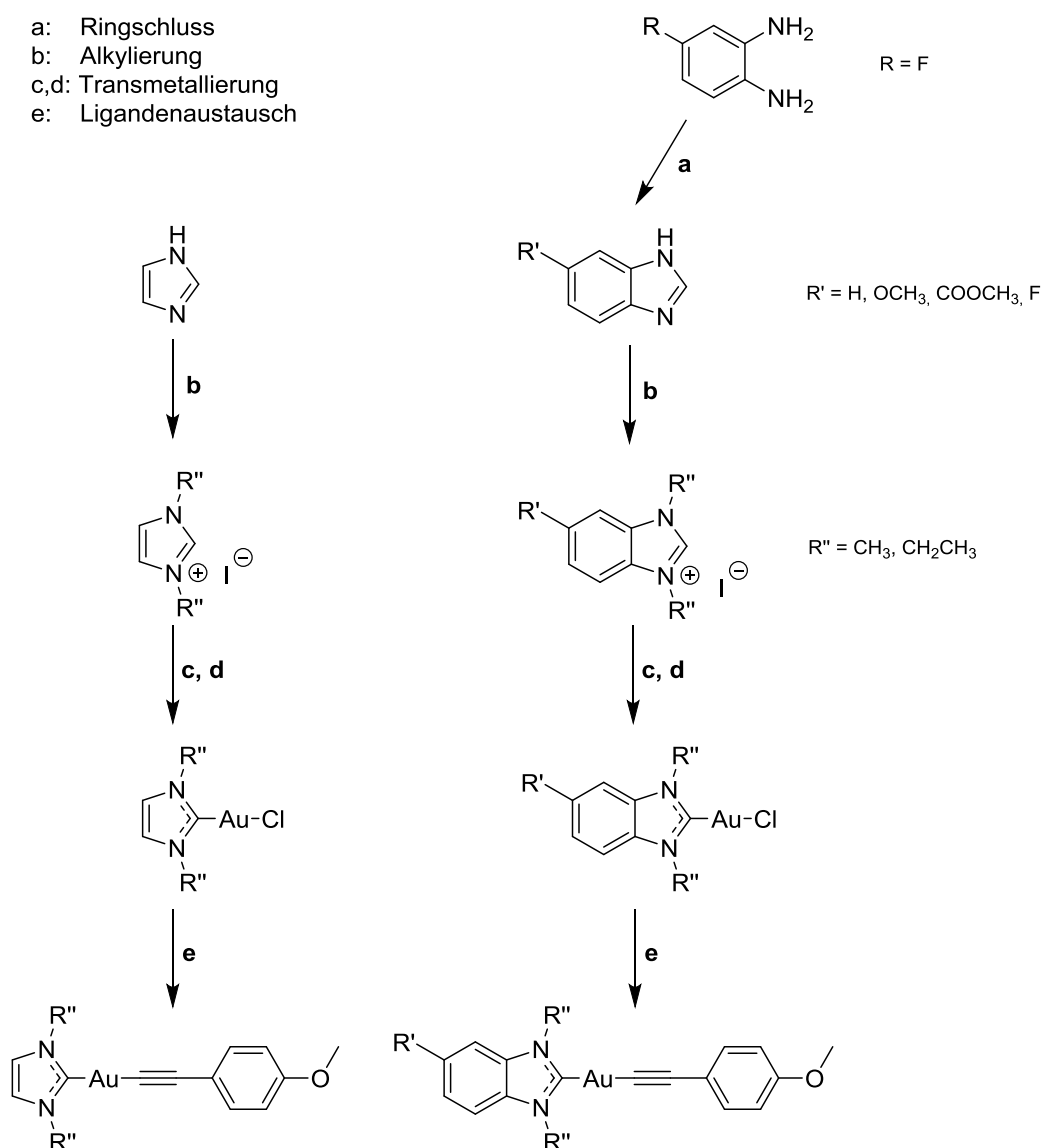
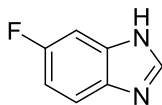


Abbildung 79 Übersicht der NHC-Au(I)-Alkinsynthese (ohne Mestranol)

8.5.1 Ringschluss (a)

5-Fluor-1*H*-benzimidazol (1)

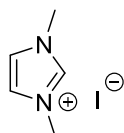


Das 5-Fluor-1*H*-benzimidazol wird als einzige NHC-Vorstufe selbst synthetisiert. Die Ausgangssubstanz 1,2-Diamino-4-fluorbenzol (0,463 g, 3,67 mmol) wird in einem Überschuss Ameisensäure unter Zugabe von 20 ml 5 M Salzsäure gelöst und mindestens ü.N. bei starkem Rühren zum Rückfluss erhitzt. Die Farbänderung von blau zu rot zeigt die Umsetzung der Edukte. Der Ansatz wird unter Eiskühlung mit konzentriertem Ammoniak tropfenweise bis pH 8 alkalisiert. Das 5-Fluor-1*H*-benzimidazol wird nach Filtration dreimal mit Ethylacetat aus dem Ansatz extrahiert, die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet und das Lösemittel unter Vakuum entfernt. Ausbeute: 442,64 mg (3,25 mmol, 88,6 %); hellbraunes Pulver; ^1H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 10,20 (s, 1H, C1/3-NH), 8,18 (s, 1H, C2), 7,60 (ddd, $J = 8,8$ und 4,7 und 0,5 Hz, 1H, C7), 7,34 (ddd, $J = 9,7$ und 2,4 und 0,5 Hz, 1H, C4), 7,06 (ddd, $J = 9,5$ und 8,8 und 2,4 Hz, 1H, C6); ^{13}C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ 159,76 (d, $J = 239,0$ Hz, C5), 141,74 (C2), 137,63 (d, $J = 13,1$ Hz, C3a), 134,45 (C7a), 116,29 (d, $J = 10,2$ Hz, C7), 111,53 (d, $J = 25,7$ Hz, C6), 101,38 (d, $J = 25,9$ Hz, C4); ^{19}F NMR (377 MHz, Chloroform-*d*) δ -119,89; Elementaranalyse $\text{C}_7\text{H}_5\text{N}_2\text{F}$ (theoretisch/gemessen): C (61,76/61,82), H(3,70/3,75), N (20,58/20,64); MS (EI): m/z 136,1 $[\text{M}]^+$

8.5.2 Alkylierung (b)

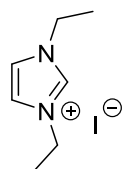
Die fünf NHC-Vorstufen werden an beiden Stickstoffen methyliert bzw. ethyliert. Für die Reaktion wird die jeweilige Ausgangssubstanz mit 1,2 Äq. Kaliumcarbonat in Acetonitril gelöst. Zwei Mal 2,0 Äq. Iodmethan ($M = 141,93 \text{ g/mol}$, $\rho = 2,27 \text{ kg/l}$) bzw. Iodethan ($M = 155,96 \text{ g/mol}$, $\rho = 1,94 \text{ kg/l}$) werden zu dem Reaktionsansatz pipettiert und dieser je nach Substanz 14 - 96 h unter Rückfluss gerührt. Der Reaktionsverlauf wird mittels Kieselgel-DC mit Ethylacetat und Hexan im Verhältnis 1 zu 1 als mobile Phase überwacht. Nach vollständiger Umsetzung wird das Acetonitril unter Vakuum abgezogen, der Ansatz in Dichlormethan resuspendiert und filtriert. Das Lösemittel wird erneut eingetrocknet und der Rückstand mit THF gewaschen und filtriert. Die alkylierten Heteroaromaten bleiben ungelöst im Filter zurück und werden in der Trockenpistole bei 50 °C nachgetrocknet.

1,3-Dimethylimidazoliumiodid (2)



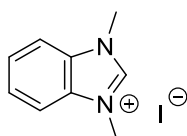
Methylierung nach Synthese b: Ausgangssubstanz: 1-Methyl-3*H*-imidazol (0,18 ml, 2,23 mmol, $\rho = 1,03 \text{ kg/l}$); Reaktionszeit 14 h unter Rückfluss und ü.N. bei RT; Ausbeute: 250,58 mg (3,01 mmol, 50,1 %); blassgelbes Pulver (stark hygroskopisch); ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 10,03 (dt, $J = 1,7$ und 0,6 Hz, 1H, C2), 7,41 (d, $J = 1,7$ Hz, 2H, C4+5), 4,11 (d, $J = 0,6$ Hz, 6H, CH₃); Elementaranalyse: C₅H₈N₂I (theoretisch/gemessen [%]): C (26,81/26,77), H (4,05/4,38), N (12,50/11,98)

1,3-Diethylimidazoliumiodid (3)



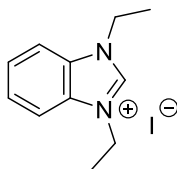
Ethylierung nach Synthese b: Ausgangssubstanz: 1*H*-Imidazol (270,1 mg, 3,97 mmol); Reaktionszeit 17 h unter Rückfluss; Ausbeute: 845,45 mg (3,35 mmol, 84,5 %); hellgelbes Pulver (stark hygroskopisch); ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 10,12 (dq, $J = 1,6$ und 0,8 Hz, 1H, C2), 7,58 (d, $J = 1,7$ Hz, 2H, C4+5), 4,44 (qd, $J = 7,3$ und 0,5 Hz, 4H, CH₂), 1,63 (t, $J = 7,4$ Hz, 6H, CH₃)

1,3-Dimethylbenzimidazoliumiodid (4)



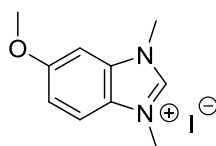
Methylierung nach Synthese b: Ausgangssubstanz: 1*H*-Benzimidazol (263,18 mg, 1,82 mmol); Reaktionszeit 16 h unter Rückfluss; Ausbeute 235,7 mg (1,86 mmol, 51,0 %); feines leicht gelbes Pulver; ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 11,18 – 11,05 (m, 1H, C2), 7,75 – 7,69 (m, 4H, C4/5/6/7), 4,28 (d, *J* = 0,6 Hz, 6H, CH₃); Elementaranalyse: C₉H₁₁N₂I (theoretisch/gemessen [%]): C (39,44/39,58), H (4,05/3,93), N (10,22/10,33); SP: 199,3 °C; MS (ESI): *m/z* 147,1 [M-I]⁺

1,3-Diethylbenzimidazoliumiodid (5)



Ethylierung nach Synthese b: Ausgangssubstanz: 1*H*-Benzimidazol (406,68 mg, 3,31 mmol); Reaktionszeit 14 h unter Rückfluss und ü.N. bei RT; Ausbeute 959,1 mg (3,17 mmol, 95,9 %); weißes Pulver; ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 10,88 (s, 1H, C2), 7,85 (dt, *J* = 6,8 und 3,4 Hz, 2H, C4+7), 7,70 (dt, *J* = 6,3 und 3,3 Hz, 2H, C5+6), 4,72 (q, *J* = 7,4 Hz, 4H, CH₂), 1,77 (t, *J* = 7,3 Hz, 6H, CH₃); Elementaranalyse: C₁₁H₁₅N₂I (theoretisch/gemessen [%]): C (43,73/43,83), H (5,00/4,87), N (9,27/9,06); SP: 165,4 °C; MS (ESI): *m/z* 175,1 [M-I]⁺, 147,1 [M-C₂H₄]⁺

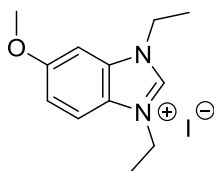
1,3-Dimethyl-5-methoxybenzimidazoliumiodid (6)



Methylierung nach Synthese b: Ausgangssubstanz: 5-Methoxy-1*H*-benzimidazol (487,3 mg, 3,29 mmol); Reaktionszeit: 21 h unter Rückfluss; Ausbeute 514,0 mg (1,69 mmol, 51,4 %); hellgelbes Pulver; ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 10,93 (s, 1H, C2), 7,57 (dd, *J* = 9,1 und 0,5 Hz, 1H, C7), 7,28 (d, *J* = 2,3 Hz, 1H, C6), 7,06 (d, *J* = 2,2 Hz, 1H, C4), 4,25 – 4,19 (m, 6H, CH₃), 3,96 (s, 3H, C5-M-CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ 159,88 (C5), 141,98 (C2), 133,04 (C3a), 125,95 (C7a), 117,78 (C4/C6/C7), 113,40 (C4/C6/C7), 94,73 (C4/C6/C7), 56,34 (C5-M-CH₃), 33,83 (C1/3-CH₃), 29,69 (C1/3-CH₃);

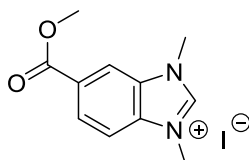
Elementaranalyse: $C_{10}H_{13}N_2IO$ (theoretisch/gemessen [%]): C (39,49/39,60), H (4,31/4,40), N (9,21/9,04); SP: 224,9 °C; MS (ESI): 162,1 [M-I-CH₃], 177,1 [M-I]⁺, 191,1 [M-I+CH]

1,3-Diethyl-5-methoxybenzimidazoliumiodid (7)



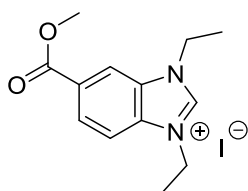
Ethylierung nach Synthese b: Ausgangssubstanz: 5-Methoxy-1*H*-benzimidazol (1,34 g, 9,03 mmol); Reaktionszeit: 14 h unter Rückfluss und ü.N. bei RT; Ausbeute: 1,98 g (5,96 mmol, 65,9 %); hellbraunes Pulver; ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 10,82 (s, 1H, C2), 7,63 (dd, *J* = 9,2 und 0,5 Hz, 1H, C7), 7,25 (dd, *J* = 9,2 und 2,3 Hz, 1H, C6), 7,16 (dd, *J* = 2,3 und 0,5 Hz, 1H, C4), 4,71 – 4,60 (m, 4H, CH₂), 1,74 (td, *J* = 7,4 und 1,4 Hz, 6H, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ 159,60 (C5), 140,20 (C2), 132,38 (C3a), 125,27 (C7a), 117,50 (C4/C6/C7), 113,72 (C4/C6/C7), 95,25 (C4/C6/C7), 56,50 (C5-M-CH₃), 43,02 (C1/3-CH₂), 42,90 (C1/3-CH₂), 14,93 (C1/3-CH₃), 14,83 (C1/3-CH₃); Elementaranalyse: $C_{12}H_{17}N_2IO$ (theoretisch/gemessen [%]): C (43,39/43,35), H (5,16/5,09), N (8,43/8,33); SP: 121,1 °C; MS (ESI): 205,1 [M-I]⁺

1,3-Dimethyl-5-methoxycarbonylbenzimidazoliumiodid (8)



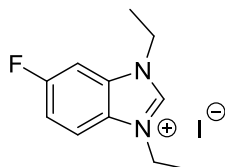
Methylierung nach Synthese b: Ausgangssubstanz: 5-Methoxycarbonyl-1*H*-benzimidazol (266,30 mg, 1,51 mmol); Reaktionszeit: 48 h unter Rückfluss; Ausbeute: 303,10 mg (0,91 mmol, 60,6 %); gelbes Pulver; ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 11,27 (s, 1H, C2), 8,43 (dd, *J* = 1,4 und 0,7 Hz, 1H, C4), 8,38 (dd, *J* = 8,7 und 1,4 Hz, 1H, C6), 7,78 (dd, *J* = 8,7 und 0,7 Hz, 1H, C7), 4,37 – 4,29 (m, 6H, CH₃), 4,03 (s, 3H, C5-E-CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ 165,08 (C5-Carbonyl), 145,21 (C2), 134,47 (C7a), 131,72 (C5), 129,62 (C3a), 128,42 (C4/C6/C7), 114,77 (C4/C6/C7), 112,79 (C4/C6/C7), 53,03 (C5-E-CH₃), 34,31 (C1/3-CH₃), 34,17 (C1/3-CH₃); Elementaranalyse: $C_{11}H_{13}N_2IO_2$ (theoretisch/gemessen [%]): C (39,78/39,81), H (3,95/4,04), N (8,43/8,35); SP: 201,8 °C; MS (ESI): 205,1 [M-I]⁺, 219,1 [M-I+CH], 233,1 [M-I+C₂H₄]

1,3-Diethyl-5-methoxycarbonylbenzimidazoliumiodid (9)



Ethylierung nach Synthese b: Ausgangssubstanz: 5-Methoxycarbonyl-1*H*-benzimidazol (488,70 mg, 2,78 mmol); Reaktionszeit: 48 h unter Rückfluss; Ausbeute: 281,1 mg (0,78 mmol, 28,1 %); hellgelbes Pulver; ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 11,32 (s, 1H, C2), 8,44 (dd, *J* = 1,4 und 0,7 Hz, 1H, C4), 8,35 (dd, *J* = 8,7 und 1,4 Hz, 1H, C6), 7,82 (dd, *J* = 8,7 und 0,7 Hz, 1H, C7), 4,75 (q, *J* = 7,4 Hz, 4H, CH₂), 4,03 (s, 3H, C5-E-CH₃), 1,82 (dt, *J* = 9,0 und 7,4 Hz, 6H, CH₃); ¹³C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ 165,12 (C5-Carbonyl), 143,68 (C2), 133,89 (C7a), 131,08 (C5), 129,40 (C3a), 128,22 (C4/C6/C7), 114,99 (C4/C6/C7), 113,10 (C4/C6/C7), 53,01 (C5-E-CH₃), 43,48 (C1/3-CH₂), 43,39 (C1/3-CH₂), 14,89 (C1- oder C3-CH₃), 14,83 (C1- oder C3-CH₃); Elementaranalyse: C₁₃H₁₇N₂IO (theoretisch/gefunden [%]): C (43,35/43,38), H (4,76/4,66), N (7,77/7,76); SP: 179,7 °C; MS (ESI): 177,1 [M-I-C₄H₈]⁺, 205,1 [M-I-C₂H₄]⁺, 233,1 [M-I]⁺

1,3-Diethyl-5-fluor-benzimidazoliumiodid (10)



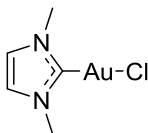
Ethylierung nach Synthese b: Ausgangssubstanz: 5-Fluor-1*H*-benzimidazol (1) (255,67 mg, 1,88 mmol); Reaktionszeit: 24 h unter Rückfluss; Ausbeute: 529,66 mg (1,65 mmol, 88,0 %); hellbraunes Pulver; ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 11,24 (s, 1H, (C2), 7,76 – 7,71 (m, 1H, C7), 7,47 – 7,41 (m, 2H, C4+6), 4,68 (dq, *J* = 16,8 und 7,4 und 0,5 Hz, 4H, CH₂), 1,78 (td, *J* = 7,3 und 3,6 Hz, 6H, CH₃); Elementaranalyse: C₁₁H₁₄N₂IF (theoretisch/gemessen [%]): C (41,27/41,47), H (4,41/4,32), N (8,75/8,69)

8.5.3 Transmetallierung (c, d)

Die hergestellten Kationen werden mittels Transmetallierung mit Silberoxid zu den NHC-Au(I)-Cl-Komplexen gekoppelt (siehe Kapitel 4.1). Hierfür wird die jeweilige NHC-Vorstufe in Dichlormethan gelöst und unter Lichtschutz und bei RT mit 0,6 Äq. Silberoxid für maximal 1 h zur Reaktion gebracht. Die vollständige Umsetzung lässt sich deutlich an dem Verschwinden des schwarzen Silberoxids erkennen. Durch Zusatz von 1,0 Äq. Chlorido(dimethylsulfid)gold(I) kommt es innerhalb von 10-48 h zur eigentlichen Transmetallierungsreaktion, bei der Silberiodid als Niederschlag ausfällt und das Produkt gelöst vorliegt. Die Transmetallierungszeit ist ligandenabhängig und für die jeweilige Substanz zusammen mit der Charakterisierung vermerkt.

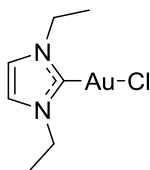
Der durchreagierte Ansatz wird über einen Filter auf eine Celite®-Säule gegeben und mit DCM durchgespült, bis die Spüllösung farblos erscheint. Die Produkte sind oft gelb bis orange gefärbt, sodass gut erkennbar ist, wann sie komplett von der Säule gewaschen wurden. Das DCM wird unter Vakuum einrotiert und die NHC-Au(I)-Cl-Komplexe in der Trockenpistole bei 40 °C nachgetrocknet.

Chlorido(1,3-dimethylimidazol-2-yliden)gold(I) (11)



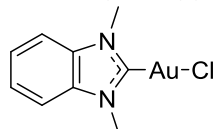
Transmetallierung nach Synthese c und d: Ausgangssubstanz 1,3-Dimethylimidazoliumiodid (2) (172,50 mg, 0,76 mmol); Reaktionszeit 30 min und 14 h; Ausbeute: 189,7 mg (0,58 mmol, 75,9 %); graugelbes Pulver; ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 6,97 (s, 2H, C4+5), 3,83 (s, 6H, CH₃); ^{13}C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ 171,63 (C2), 121,72 (C4+5), 38,17 (CH₃); Elementaranalyse: C₅H₈N₂AuCl (theoretisch/gemessen [%]): C (18,28/18,27), H (2,45/2,33), N (8,53/8,47); SP: 158,5 °C; MS (EI): 419,9 [M-Cl+I]⁺, 328,0 [M]⁺, 293,1 [M-Cl]⁺

Chlorido(1,3-diethylimidazol-2-yliden)gold(I) (12)



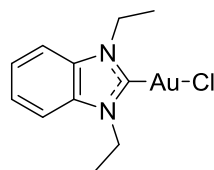
Transmetallierung nach Synthese c und d: Ausgangssubstanz: 1,3-Diethylimidazoliumiodid (3) (139,5 mg, 0,55 mmol); Reaktionszeit: 30 min und 14 h; Ausbeute: 171,8 mg (0,48 mmol, 87,1 %); graubraunes Pulver; ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 6,97 (s, 2H, C4+5), 4,23 (q, $J = 7,3$ Hz, 4H, CH₂), 1,47 (t, $J = 7,3$ Hz, 6H, CH₃); Elementaranalyse: C₇H₁₂N₂AuCl (theoretisch/gemessen [%]): C (23,57/23,63), H (3,40/3,33), N (7,86/7,68); SP: 154,3 °C; MS (EI): m/z 447,9 [M-Cl+I]⁺, 356,0 [M]⁺, 321,1 [M-Cl]⁺

Chlorido(1,3-dimethylbenzimidazol-2-yliden)gold(I) (13)



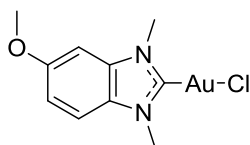
Transmetallierung nach Synthese c und d: Ausgangssubstanz: 1,3-Dimethylbenzimidazoliumiodid (4) (181,60 mg, 0,66 mmol), Reaktionszeit: 30 min und 10 h; Ausbeute: 147,0 mg (0,39 mmol, 58,8 %); orangenes Pulver; ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,47 (s, 4H, C4+5+6+7), 4,05 (s, 6H, CH₃); Elementaranalyse: C₉H₁₀N₂AuCl (theoretisch/gemessen [%]): C (28,55/29,20), H (2,67/2,54), N (7,40/7,43); SP: 283,0 °C

Chlorido(1,3-diethylbenzimidazol-2-yliden)gold(I) (14)



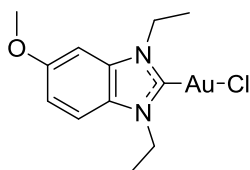
Transmetallierung nach Synthese c und d: Ausgangssubstanz: 1,3-Diethylbenzimidazoliumiodid (5) (371,6 mg, 1,23 mmol); Reaktionszeit: 30 min und 21 h; Ausbeute: 437,2 mg (1,07 mmol, 87,4 %); braunoranges Pulver; ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,55 – 7,38 (m, 4H, C4+5+6+7), 4,55 (q, $J = 7,3$ Hz, 4H, CH₂), 1,54 (t, $J = 7,3$ Hz, 6H, CH₃); Elementaranalyse: C₁₁H₁₄N₂AuCl (theoretisch/gemessen [%]): C (32,49/32,50), H (3,47/3,43), N (6,89/6,45); SP: 208,9 °C

Chlorido(1,3-dimethyl-5-methoxybenzimidazol-2-yliden)gold(I) (15)



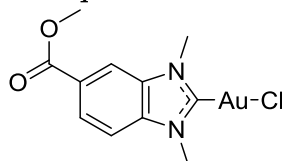
Transmetallierung nach Synthese c und d: Ausgangssubstanz: 1,3-Dimethyl-5-methoxybenzimidazoliumiodid (6) (186,9 mg, 0,61 mmol); Reaktionszeit 30 min und 30 h; Ausbeute: 67,0 mg (0,16 mmol, 26,8 %); hellgelbes Pulver; ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,33 (d, J = 8,9 Hz, 1H, C7), 7,05 (dd, J = 8,9 und 2,3 Hz, 1H, C6), 6,88 (d, J = 2,3 Hz, 1H, C4), 4,00 (d, J = 3,2 Hz, 6H, CH₃), 3,90 (s, 3H, C5-M-CH₃); ^{13}C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ 178,34 (C2), 157,99 (C5), 134,60 (C3a), 128,12 (C7a), 113,50 (C4/C6/C7), 111,81 (C4/C6/C7), 94,69 (C4/C6/C7), 56,06 (C5-M-CH₃), 35,17 (C1/3-CH₃), 35,02 (C1/3-CH₃); Elementaranalyse: C₁₀H₁₂N₂AuOCl (theoretisch/gemessen [%]): C (29,39/29,75), H (2,96/2,53), N (6,86/6,42); MS (EI): m/z 499,9 [M-Cl+I]⁺, 408,0 [M]⁺; 373,0 [M-Cl]⁺

Chlorido(1,3-diethyl-5-methoxybenzimidazol-2-yliden)gold(I) (16)



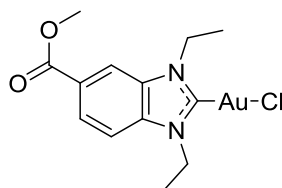
Transmetallierung nach Synthese c und d: Ausgangssubstanz: 1,3-Diethyl-5-methoxybenzimidazoliumiodid (7) (191,1 mg, 0,57 mmol); Reaktionszeit 30 min und 24 h; Ausbeute: 84,9 mg (0,19 mmol, 34,0 %); graugelbes Pulver; ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,35 (dd, J = 8,9 und 0,5 Hz, 1H, C7), 7,02 (dd, J = 8,9 und 2,3 Hz, 1H, C6), 6,89 (dd, J = 2,3 und 0,5 Hz, 1H, C4), 4,49 (qd, J = 7,3 und 3,1 Hz, 4H, CH₂), 3,90 (s, 3H, C5-M-CH₃), 1,52 (td, J = 7,3 und 0,9 Hz, 6H, CH₃); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 176,50 (C2), 157,77 (C5), 133,64 (C3a), 127,11 (C7a), 113,24 (C4/C6/C7), 111,97 (C4/C6/C7), 94,97 (C4/C6/C7), 56,10 (C5-M-CH₃), 43,98 (C1/3-CH₂), 43,72 (C1/3-CH₂), 15,52 (C1/3-CH₃), 15,31 (C1/3-CH₃); Elementaranalyse: C₁₂H₁₆N₂AuClO (theoretisch/gemessen [%]): C (33,01/32,61), H (3,69/3,51), N (6,42/6,04); MS (ESI): m/z 436,06 [M]⁺; 401,09 [M-Cl]⁺

Chlorido(1,3-dimethyl-5-methoxycarbonylbenzimidazol-2-yliden)gold(I) (17)



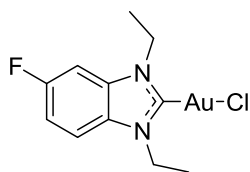
Transmetallierung nach Synthese c und d: Ausgangssubstanz: 1,3-Dimethyl-5-methoxycarbonylbenzimidazoliumiodid (**8**) (183,2 mg, 0,57 mmol); Reaktionszeit: 30 min und 24 h; Ausbeute: 148,1 mg (0,34 mmol, 59,2 %); gelbes Pulver; ^1H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 8,21 (dd, J = 1,4 und 0,7 Hz, 1H, C4), 8,19 (dd, J = 8,5 und 1,4 Hz, 1H, C6), 7,52 (dd, J = 8,6 und 0,7 Hz, 1H, C7), 4,10 (d, J = 10,4 Hz, 6H, CH₃), 4,00 (s, 3H, C5-E-CH₃); ^{13}C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ 181,98 (C2), 166,08 (C5-Carbonyl), 136,45 (C7a), 133,54 (C5), 126,91 (C3a), 126,18 (C4/C6/C7), 113,18 (C4/C6/C7), 110,96 (C4/C6/C7), 52,68 (C5-E-CH₃), 35,36 (C1/3-CH₃), 35,34 (C1/3-CH₃); Elementaranalyse: C₁₁H₁₂N₂AuClO₂ (theoretisch/gemessen [%]): C (30,26/), H (2,54/), N (6,42/); MS (EI): m/z 436,0 [M]⁺; 401,0 [M-Cl]⁺

Chlorido(1,3-diethyl-5-methoxycarbonylbenzimidazol-2-yliden)gold(I) (18)



Transmetallierung nach Synthese c und d: Ausgangssubstanz: 1,3-diethyl-5-methoxycarbonylbenzimidazoliumiodid (**9**) (194,50 mg, 0,54 mmol); Reaktionszeit: 30 min und 24 h; Ausbeute: 212,8 mg (0,46 mmol, 85,1 %); gelbes Pulver; ^1H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 8,21 (dd, J = 1,4 und 0,7 Hz, 1H, C4), 8,15 (dd, J = 8,6 und 1,4 Hz, 1H, C6), 7,52 (dd, J = 8,6 und 0,7 Hz, 1H, C7), 4,58 (dq, J = 12,1 und 7,3 Hz, 4H, CH₂), 4,00 (s, 3H, C5-E-CH₃), 1,59 – 1,54 (m, 6H, CH₃); ^{13}C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ 180,27 (C2), 166,13 (C5-Carbonyl), 135,61 (C7a), 132,62 (C5), 126,70 (C3a), 125,96 (C4/C6/C7), 113,30 (C4/C6/C7), 111,08 (C4/C6/C7), 52,67 (C5-E-CH₃), 44,25 (C1/3-CH₂), 44,23 (C1/3-CH₂), 15,61 (C1/3-CH₃), 15,46 (C1/3-CH₃); Elementaranalyse: C₁₃H₁₆N₂AuClO₂ (theoretisch/gemessen [%]): C (33,60/33,25), H (3,47/3,43), N (6,03/5,72); SP: 247,4 °C; MS (EI): m/z 555,9 [M-Cl+I]⁺, 464,0 [M]⁺; 429,0 [M-Cl]⁺

Chlorido(1,3-diethyl-5-fluorbenzimidazol-2-yliden)gold(I) (19)

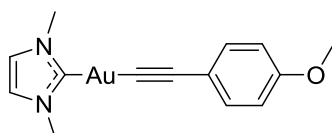


Transmetallierung nach Synthese c und d: Ausgangssubstanz: 1,3-Diethyl-5-fluorbenzimidazoliumiodid (**10**) (85,92 mg, 0,27 mmol); Reaktionszeit: 30 min und 24 h; Ausbeute: 87,59 mg (0,21 mmol, 76,5 %); hellbraunes Pulver; ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,42 (dd, J = 9,5 und 4,2 Hz, 1H, C7), 7,19 (ddq, J = 9,5 und 4,9 und 2,3 Hz, 2H, C4+6), 4,51 (dq, J = 12,8 und 7,3 Hz, 4H, CH₂), 1,58 – 1,49 (m, 6H, CH₃); Elementaranalyse: C₁₁H₁₃N₂AuClF (theoretisch/gemessen [%]): C (31,11/30,85), H (3,09/2,96), N (6,60/6,51)

8.5.4 Ligandenaustausch(e)

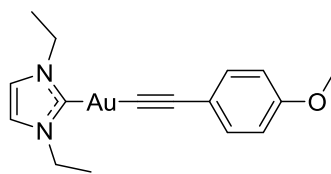
Der abschließende Schritt ist der Ligandenaustausch von Chlorido- zu Alkinligand dar. Für den Austausch werden 1,2 Äq. des jeweiligen Alkins in Methanol gelöst und mit 7,0 Äq. Kaliumhydroxid alkalisiert. Die Lösung wird für ca. 15 min unter Rühren zum Rückfluss erhitzt. 1,0 Äq. des jeweiligen NHC-Au(I)-Cl-Komplexes wird zu dem Ansatz gegeben und bei Löslichkeitsproblemen tropfenweise DCM bis zum Auflösen des NHC-Au(I)-Cl-Komplexes dazugegeben. Je nach verwendetem Alkin und NHC-Au(I)-Cl-Komplex werden die Ansätze unter Rückfluss 1 bis 96 h gerührt. Der Reaktionsendpunkt, welcher bei kompletter NHC-Au(I)-Cl-Komplexumsetzung erreicht ist, wird mittels Aluminiumoxid-DC mit Hexan und Ethylacetat im Verhältnis 1 zu 1 als mobile Phase bestimmt. Das Lösemittel wird unter Vakuum abgezogen und der Rückstand in DCM resuspendiert. Die Suspension wird filtriert, dreimal mit Wasser gewaschen und die organische Phase mit Natriumsulfat getrocknet. Das DCM wird unter Vakuum entfernt und das Produkt in der Trockenpistole bei 40 °C getrocknet. Falls Alkinrückstände auftreten, kann mit alkalisiertem dH₂O erneut extrahiert werden. Sollte das Produkt andere Verunreinigungen aufweisen, kann über eine Aluminiumoxid-Säule mit Hexan und Ethylacetat im Verhältnis 1 zu 1 als mobile Phase eine weitere Reinigung durchgeführt werden.

(1,3-Dimethylimidazol-2-yliden)(2-(4-methoxyphenyl)-ethynyl)gold(I) (20)



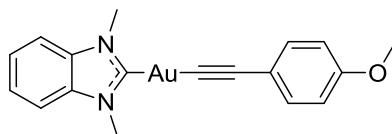
Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-dimethylimidazol-2-yliden)gold(I) (**11**) (78,50 mg, 0,24 mmol); Reaktionszeit: 10 min und 2 h; Ausbeute: 36,63 mg (0,09 mmol, 36,0 %); hellbraunes Pulver; ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,49 – 7,40 (m, 2H, AA-C2+6), 6,89 (s, 2H, C4+5), 6,81 – 6,74 (m, 2H, AA-C3+5), 3,85 (s, 6H, CH₃), 3,78 (s, 3H, AA-C4-M-CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 188,05 (C2), 158,11 (AA-C4), 133,55 (AA-C2+6), 125,91 (A-C1), 121,64 (C4+5), 117,93 (AA-C1), 113,40 (AA-C3+5), 105,11 (A-C2), 55,14 (AA-C4-M-CH₃), 37,84 (CH₃); Elementaranalyse: C₁₄H₁₅N₂AuO (theoretisch/gemessen [%]): C (39,64/39,14), H (3,56/3,62), N (6,60/6,62); SP: 180,1 °C; MS (EI): m/z 424,1 [M]⁺, 409,1 [M-CH₃]⁺, 328,0 [M-NHC]⁺, 293,0 [M-Alkin]⁺

(1,3-Diethylimidazol-2-yliden)(2-(4-methoxyphenyl)-ethynyl)gold(I) (21)



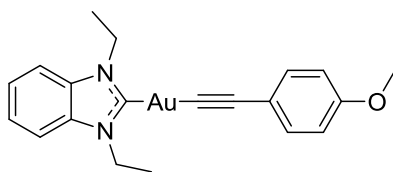
Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-diethylimidazol-2-yliden)gold(I) (**12**) (78,40 mg, 0,22 mmol); Reaktionszeit: 10 min und 4 h; Ausbeute: 45,70 mg (0,10 mmol, 45,9 %); braunes Pulver; ^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 7,47 – 7,42 (m, 2H, AA-C2+6), 6,92 (s, 2H, C4+5), 6,79 – 6,75 (m, 2H, AA-C3+5), 4,26 (q, J = 7,3 Hz, 4H, CH_2), 3,78 (s, 3H, AA-C4-M- CH_3), 1,47 (t, J = 7,3 Hz, 6H, CH_3); ^{13}C NMR (126 MHz, Chloroform- d) δ 186,39 (C2), 158,10 (AA-C4), 133,59 (AA-C2+6), 125,95 (A-C1), 119,76 (C4+5), 117,98 (AA-C1), 113,38 (AA-C3+5), 105,05 (A-C2), 55,15 (AA-C4-M- CH_3), 46,13 (C1/3- CH_2), 16,72 (C1/3- CH_3); Elementaranalyse: $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{AuO}$ (theoretisch/gemessen [%]): C (42,48/42,59), H (4,24/4,19), N (6,19/5,90);

(1,3-Dimethylbenzimidazol-2-yliden)(2-(4-methoxyphenyl)-ethynyl)gold(I) (22)



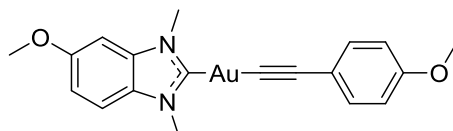
Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-dimethylbenzimidazol-2-yliden)gold(I) (**13**) (79,80 mg, 0,21 mmol); Reaktionszeit: 10 min und 2 h; Ausbeute: 65,60 mg (0,14 mmol, 65,9 %); beigelgelbes Pulver; ^1H NMR (400 MHz, Chloroform- d) δ 7,48 – 7,45 (m, 2H, AA-C2+6), 7,44 (s, 4H, C4+5+6+7), 6,82 – 6,76 (m, 2H, AA-C3+5), 4,06 (s, 6H, CH_3), 3,79 (s, 3H, AA-C4-M- CH_3); ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform- d) δ 194,81 (C2), 158,23 (AA-C4), 133,97 (A-C1), 133,59 (AA-C2+6), 125,90 (C3a+7a), 124,30 (C5+6), 117,78 (AA-C1), 113,45 (AA-C3+5), 110,96 (C4+7), 105,56 (A-C2), 55,16 (AA-C4-M- CH_3), 34,72 (CH_3); Elementaranalyse: $\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{AuO}$ (theoretisch/gemessen [%]): C (45,58/46,12), H (3,61/3,63), N (5,91/5,71); SP: 240,6 °C; MS (EI): m/z 474,0 $[\text{M}]^+$; 459,0 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$, 343,0 $[\text{M}-\text{Alkin}]^+$, 328,0 $[\text{M}-\text{NHC}]^+$,

(1,3-Diethylbenzimidazol-2-yliden)(2-(4-methoxyphenyl)-ethynyl)gold(I) (23)



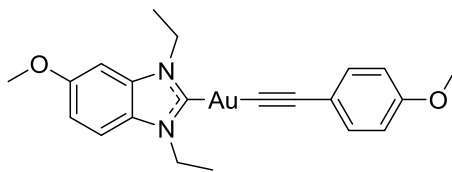
Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-diethylbenzimidazol-2-yliden)gold(I) (**14**) (161,90 mg, 0,40 mmol); Reaktionszeit: 10 min und 8 h; Ausbeute: 125,60 mg (0,25 mmol, 62,5 %); beigelgelbes Pulver; ^1H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,49 – 7,45 (m, 4H, C₅₊₆ und AA-C₂₊₆), 7,41 (ddd, J = 5,8 und 3,4 Hz, 2H, C₄₊₇), 6,81 – 6,77 (m, 2H, AA-C₃₊₅), 4,58 (q, J = 7,3 Hz, 4H, CH₂), 3,79 (s, 3H, AaC₄-M-CH₃), 1,54 (t, J = 7,3 Hz, 6H, CH₃); ^{13}C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ 193,37 (C₂), 158,19 (AA-C₄), 133,62 (A-C₁), 133,03 (AA-C₂₊₆), 126,09 (C_{3a+7a}), 124,07 (C₅₊₆), 117,74 (AA-C₁), 113,40 (AA-C₃₊₅), 111,22 (C₄₊₇), 105,41 (A-C₂), 55,15 (AA-C₄-M-CH₃), 43,53 (C₁₊₃-CH₂), 15,66 (C₁₊₃-CH₃); Elementaranalyse: C₂₀H₂₁N₂AuO (theoretisch/gemessen [%]): C (47,82/47,40), H (4,21/4,21), N (5,58/5,39); SP: 179,2 °C; MS (EI): m/z 502,1 [M]⁺; 487,0 [M-CH₃]⁺; 371,1 [M-Alkin]⁺; 328,0 [M-NHC]⁺

(1,3-Dimethyl-5-methoxybenzimidazol-2-yliden)(2-(4-methoxyphenyl)-ethynyl)gold(I) (24)



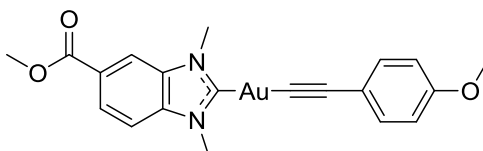
Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-dimethyl-5-methoxybenzimidazol-2-yliden)gold(I) (**15**) (60,30 mg, 0,15 mmol); Reaktionszeit: 10 min und 4 h; Ausbeute: 30,79 mg (0,06 mmol, 40,7 %); graues Pulver; ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,50 – 7,42 (m, 2H, AA-C₂₊₆), 7,30 (dd, J = 8,9 und 0,5 Hz, 1H, C₇), 7,02 (dd, J = 8,8 und 2,3 Hz, 1H, C₆), 6,86 (d, J = 2,3 Hz, 1H, C₄), 6,82 – 6,76 (m, 2H, AA-C₃₊₅), 4,01 (d, J = 2,0 Hz, 6H, CH₃), 3,89 (s, 3H, AA-C₄-M-CH₃), 3,79 (s, 3H, C₅-M-CH₃); ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 194,40 (C₂), 158,21 (AA-C₄), 157,84 (C₅), 134,94 (A-C₁), 133,59 (AA-C₂₊₆), 128,49 (C_{3a}), 125,94 (C_{7a}), 117,83 (AA-C₁), 113,44 (C_{4/C6/C7}), 113,17 (A-Ar-C₃₊₅), 111,60 (C_{4/C6/C7}), 105,52 (A-C₂), 94,60 (C_{4/C6/C7}), 56,03 (C₅-M-CH₃), 55,16 (AA-C₄-M-CH₃), 34,79 (C_{1/3}-CH₃), 34,65 (C_{1/3}-CH₃); Elementaranalyse: C₁₉H₁₉N₂AuO₂ (theoretisch/gemessen [%]): C (45,25/45,34), H (3,80/3,73), N (5,55/5,33); SP: 236,0 °C; MS (EI): m/z 504,1 [M]⁺; 489,1 [M-CH₃]⁺; 474,0 [M-C₂H₆]⁺; 446,0 [M-C₄H₁₀]⁺; 373,1 [M-Alkin]⁺

(1,3-Diethyl-5-methoxybenzimidazol-2-yliden)(2-(4-methoxyphenyl)-ethynyl)gold(I) (25)



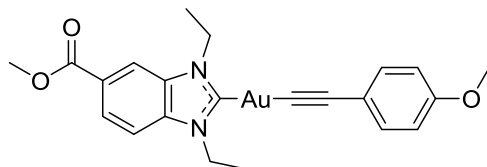
Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-diethyl-5-methoxybenzimidazol-2-yliden)gold(I) (**16**) (151,9 mg, 0,35 mmol); Reaktionszeit: 10 min und 60 h; Ausbeute: 62,5 mg (0,12 mmol, 35,8 %); hellgelbes Pulver; ^1H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,51 – 7,44 (m, 2H, AA-C2+6), 7,33 (dd, J = 8,9 und 0,5 Hz, 1H, C7), 7,01 (dd, J = 8,9 und 2,3 Hz, 1H, C6), 6,88 (dd, J = 2,3 und 0,5 Hz, 1H, C4), 6,81 – 6,76 (m, 2H, AA-C3+5), 4,52 (qd, J = 7,3, 4,1 Hz, 4H, CH₂), 3,89 (s, 3H, AA-C4-M-CH₃), 3,79 (s, 3H, C5-M-CH₃), 1,52 (td, J = 7,3 und 1,6 Hz, 6H, CH₃); ^{13}C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ 192,96 (C2), 158,16 (AA-C4), 157,57 (C5), 133,96 (A-C1), 133,60 (AA-C2+6), 127,48 (C3a), 126,06 (C7a), 117,76 (AA-C1), 113,39 (C4/C6/C7), 112,85 (AA-C3+5), 111,81 (C4/C6/C7), 105,38 (A-C2), 94,87 (C4/C6/C7), 56,05 (C5-M-CH₃), 55,13 (AA-C4-M-CH₃), 43,60 (C1/3-CH₂), 43,34 (C1/3-CH₂), 15,72 (C1/3-CH₃), 15,50 (C1/3-CH₃); Elementaranalyse: C₂₁H₂₃N₂AuO₂ (theoretisch/gemessen [%]): C (47,38/47,51), H (4,35/4,41), N (5,26/5,20); SP: 163,5 °C; MS (EI): m/z 532,1 [M]⁺; 517,1 [M-CH₃]⁺, 502,1 [M-C₂H₆]⁺, 474,1 [M-C₄H₁₀]⁺, 401,1 [M-Alkin]⁺, 328,0 [M-NHC]⁺

(1,3-Dimethyl-5-methoxycarbonylbenzimidazol-2-yliden)(2-(4-methoxyphenyl)-ethynyl)gold(I) (26)



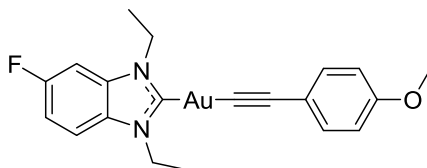
Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-dimethyl-5-methoxycarbonylbenzimidazol-2-yliden)gold(I) (**17**) (75,40 mg, 0,17 mmol); Reaktionszeit: 10 min und 24 h; Ausbeute: 14,16 mg (0,03 mmol, 15,4 %); braunes Pulver; ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8,20 – 8,13 (m, 2H, C4+6), 7,50 – 7,44 (m, 3H, C7 und AA-C2+6), 6,82 – 6,77 (m, 2H, AA-C3/5), 4,12 (s, 3H, C1/3-CH₃), 4,10 (s, 3H, C1/3-CH₃), 3,99 (s, 3H, C5-E-CH₃), 3,79 (s, 3H, AA-C4-M-CH₃); Elementaranalyse: C₂₀H₁₉N₂AuO₃ (theoretisch/gemessen [%]): C (45,12/45,72), H (3,60/3,38), N (5,26/4,91); MS (ESI): m/z 533,1 [M]⁺

(1,3-Diethyl-5-methoxycarbonylbenzimidazol-2-yliden)(2-(4-methoxyphenyl)-ethynyl)gold(I) (27)



Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-dimethyl-5-methoxycarbonylbenzimidazol-2-yliden)gold(I) (**18**) (82,3 mg, 0,18 mmol); Reaktionszeit: 10 min und 4 h; Ausbeute: 21,14 mg (0,04 mmol, 21,3 %); gelbes Pulver; ^1H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 8,18 (dd, $J = 1,5$ und 0,6 Hz, 1H, C4), 8,13 (dd, $J = 8,7$ und 1,5 Hz, 1H, C6), 7,50 (dd, $J = 8,7$ und 0,6 Hz, 1H, C7), 7,48 – 7,40 (m, 2H, AA-C2+6), 6,84 – 6,74 (m, 2H, AA-C3+5), 4,61 (p, $J = 7,4$ Hz, 4H, CH₂), 3,99 (s, 3H, C5-E-CH₃), 3,79 (s, 3H, AA-C4-M-CH₃), 1,57 (td, $J = 7,3$ und 5,7 Hz, 6H, CH₃); ^{13}C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 196,28 (C2), 166,24 (C5-Carbonyl), 158,22 (AA-C4), 135,91 (C7a), 133,56 (AA-C2+6), 132,89 (C5), 126,32 (C3a), 125,74 (C4/C6/C7), 125,65 (A-C1), 117,57 (AA-C1), 113,40 (AA-C3+5), 113,12 (C4/C6/C7), 110,92 (C4/C6/C7), 105,53 (A-C2), 55,13 (AA-C4-M-CH₃), 52,55 (C5-E-CH₃), 43,82 (C1/3-CH₂), 43,79 (C1/3-CH₂), 15,77 (C1/3-CH₃), 15,63 (C1/3-CH₃); Elementaranalyse: C₂₂H₂₄N₂AuO₃ (theoretisch/gemessen [%]): C (47,04/46,78), H (4,31/3,85), N (4,99/4,71); SP: 213,9 °C; MS (EI): 560,0 [M]⁺, 545,0 [M-CH₃]⁺, 429,0 [M-Alkin]⁺, 328,0 [M-NHC]⁺

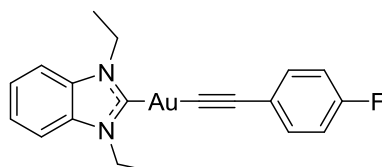
(1,3-Diethyl-5-fluorbenzimidazol-2-yliden)(2-(4-methoxyphenyl)-ethynyl)gold(I) (28)



Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-diethyl-5-fluorbenzimidazol-2-yliden)gold(I) (**19**) (290,90 mg, 0,69 mmol); Reaktionszeit: 8 min und 48 h; Ausbeute: 255,9 mg (0,49 mmol, 71,8 %); braungelbes Pulver; ^1H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,49 – 7,44 (m, 2H, AA-C2+6), 7,40 (dd, $J = 9,6$ und 4,2 Hz, 1H, C7), 7,19 – 7,14 (m, 2H, C4+6), 6,81 – 6,77 (m, 2H, AA-C3+5), 4,54 (dq, $J = 18,7$ und 7,3 Hz, 4H, CH₂), 3,79 (s, 3H, AA-C4-M-CH₃), 1,53 (td, $J = 7,3$ und 3,8 Hz, 6H, CH₃); ^{13}C NMR (151 MHz, Chloroform-*d*) δ 195,02 (C2), 160,23 (d, $J = 244,1$ Hz, C5), 158,24 (AA-C4), 135,17 (A-C1), 133,6 (AA-C2+6), 133,59 (d, $J = 12,2$ Hz, C3a), 129,54 (d, $J = 1,1$ Hz, C7a), 117,63 (AA-C1), 113,42 (AA-C3+5), 112,36 (d, $J = 25,7$ Hz, C4/C6/C7), 112,09 (d, $J = 10,1$ Hz,

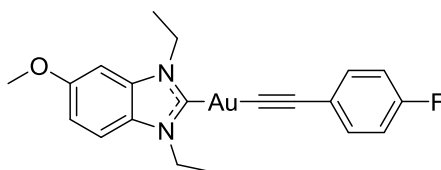
C4/C6/C7), 105,50 (A-C2), 98,40 (d, $J = 27,6$ Hz, (C4/C6/C7), 55,14 (AA-C4-M-CH₃), 43,79 (C1/3-CH₂), 43,72 (C1/3-CH₂), 15,65 (C1/3-CH₃), 15,47 (C1/3-CH₃); ¹⁹F NMR (377 MHz, Chloroform-*d*) δ -117,00; Elementaranalyse: C₂₀H₂₀N₂AuFO (theoretisch/gemessen [%]): C (46,16/45,93), H (3,87/3,53), N (5,38/5,24); MS (EI): 520,1 [M]⁺; 505,1 [M-CH₃]⁺, 389,1 [M-Alkin]⁺, 328,0 [M-NHC]⁺

(1,3-Diethylbenzimidazol-2-yliden)(2-(4-fluorphenyl)-ethinyl)gold(I) (29)



Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-diethylbenzimidazol-2-yliden)gold(I) (**14**) (296,70 mg, 0,73 mmol); Reaktionszeit: 10 min und 60 h; Ausbeute: 24,75 mg (0,05 mmol, 55,0 %); beiges Pulver; ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,51 – 7,45 (m, 4H, C₅+6 und AA-C₂+6), 7,42 (m, 2H, C₄+7); 6,93 (t, $J = 8,9$ Hz, 2H, AA-C₃+5), 4,58 (q, $J = 7,3$ Hz, 4H, CH₂), 1,55 (t, $J = 7,3$ Hz, 6H; CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 193,14 (C₂), 161,44 (d, $J = 246,4$ Hz, AA-C₄), 133,96 (d, $J = 8,1$ Hz, AA-C₂+6), 133,04 (A-C₁), 127,78 (d, $J = 1,3$ Hz, C_{3a}+7a), 124,15 (C₅+6), 121,55 (AA-C₁), 114,95 (d, $J = 21,8$ Hz, AA-C₃+5), 111,26 (C₄+7), 104,39 (A-C₂), 43,57 (CH₂), 15,68 (CH₃); ¹⁹F NMR (377 MHz, Chloroform-*d*) δ -114,146 (d, $J = 216$ Hz); MS (ESI): m/z 491,1 [M+H]⁺

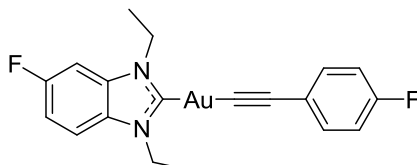
(1,3-Diethyl-5-methoxybenzimidazol-2-yliden)(2-(4-fluorphenyl)-ethinyl)gold(I) (30)



Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-diethyl-5-methoxybenzimidazol-2-yliden)gold(I) (**16**) (143,1 mg, 0,33 mmol); Reaktionszeit: 10 min und 60 h; Ausbeute: 50,30 mg (0,10 mmol, 29,5 %); braungelbes Pulver; ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,53 – 7,45 (m, 2H, AA-C₂+6), 7,33 (dd, $J = 8,9$ und 0,5 Hz, 1H, C₇), 7,01 (dd, $J = 8,9$ und 2,3 Hz, 1H, C₆), 6,97 – 6,89 (m, 2H, AA-C₃+5), 6,88 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, C₄), 4,52 (qd, $J = 7,3$ und 4,0 Hz, 4H, CH₂), 3,89 (s, 3H, C₅-M-CH₃), 1,53 (td, $J = 7,3$ und 1,1 Hz, 6H, CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 192,76 (C₂), 162,42 (d, $J = 246,4$ Hz, AA-C₄), 157,66 (C₅), 133,99 (A-C₁), 133,95 (d, $J = 8,1$ Hz, AA-C₂+6), 127,81 (C_{3a}), 127,51 (C_{7a}), 121,57 (d, $J = 3,4$ Hz, AA-C₁), 114,93 (d, $J = 21,8$ Hz, AA-C₃+5), 112,96

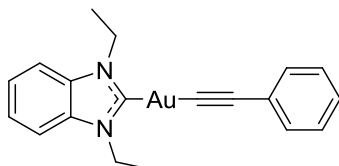
(C₄/C₆/C₇), 111,86 (C₄/C₆/C₇), 104,36 (A-C₂), 94,91 (C₄/C₆/C₇), 56,08 (C₅-M-CH₃), 43,64 (C_{1/3}-CH₂), 43,38 (C_{1/3}-CH₂), 15,75 (C_{1/3}-CH₃), 15,52 (C_{1/3}-CH₃); ¹⁹F NMR (377 MHz, Chloroform-*d*) δ -114,52 (d, *J* = 4,0 Hz); Elementaranalyse: C₂₀H₂₀N₂AuFO (theoretisch/gemessen [%]): C (46,16/46,84), H (3,87/4,17), N (5,38/5,68); MS (EI): *m/z* 520,1 [M]⁺; 505,1 [M-CH₃]⁺; 401, [M-Alkin]⁺; 188,0 [M-NHC]⁺

(1,3-Diethyl-5-fluorbenzimidazol-2-yliden)(2-(4-fluorphenyl)-ethynyl)gold(I) (31)



Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-diethyl-5-fluorbenzimidazol-2-yliden)gold(I) (19) (282,60 mg, 0,67 mmol); Reaktionszeit: 8 min und 48 h; Ausbeute: 251,90 mg (251,9 mmol, 72,3 %); graubraunes Pulver; ¹H NMR (600 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,51 – 7,45 (m, 2H, AA-C₂+6), 7,40 (dd, *J* = 9,5 und 4,2 Hz, 1H, C₇), 7,20 – 7,14 (m, 2H, C₄+6), 6,97 – 6,89 (m, 2H, AA-C₃+5), 4,54 (dq, *J* = 18,8 und 7,3 Hz, 4H, CH₂), 1,54 (td, *J* = 7,3 und 3,9 Hz, 6H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 194,76 (C₂), 162,04 (d, *J* = 117,6 Hz, AA-C₄), 159,60 (d, *J* = 115,2 Hz, C₅), 133,88 (d, *J* = 8,1 Hz, AA-C₂+6), 133,57 (d, *J* = 12,1 Hz, C_{3a}), 129,52 (A-C₁), 127,54 (C_{7a}), 121,47 (d, *J* = 3,4 Hz, AA-C₁), 114,91 (d, *J* = 21,8 Hz, AA-C₃+5), 112,41 (d, *J* = 25,8 Hz, C₄/C₆/C₇), 112,11 (d, *J* = 10,1 Hz, C₄/C₆/C₇), 104,36 (A-C₂), 98,39 (d, *J* = 27,6 Hz, C₄/C₆/C₇), 43,81 (C_{1/3}-CH₂), 43,73 (C_{1/3}-CH₂), 15,63 (C_{1/3}-CH₃), 15,46 (C_{1/3}-CH₃); ¹⁹F NMR (377 MHz, Chloroform-*d*) δ -114,33 (d, *J* = 3,3 Hz, Alkin), -116,87 (NHC); Elementaranalyse: C₁₉H₁₇N₂AuF₂ (theoretisch/gemessen [%]): C (44,89/45,38), H (3,37/3,39), N (5,51/5,55); MS (EI): 508,1 [M]⁺; 389,1 [M-Alkin]⁺; 316,0 [M-NHC]⁺

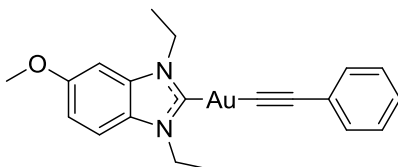
(1,3-Diethylbenzimidazol-2-yliden)(2-phenylethynyl)gold(I) (32)



Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-diethylbenzimidazol-2-yliden)gold(I) (14) (38,70 mg, 0,10 mmol); Reaktionszeit: 10 min und 60 h; Ausbeute: 27,45 mg (0,06 mmol, 61,0 %); beiges Pulver; ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,56 – 7,51 (m, 2H, AA-C₂+6), 7,50 – 7,39 (m, *J* = 6,3 und 3,4 Hz, 2H, C₄/5/6/7), 7,26 – 7,23 (m, 2H, AA-C₃+5), 7,21 – 7,17 (m, 1H, AA-

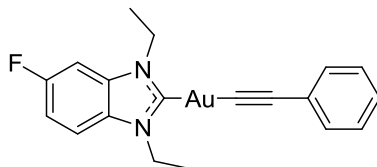
C4), 4,58 (q, $J = 7,3$ Hz, 4H, CH₂), 1,55 (t, $J = 7,3$ Hz, 6H, CH₃); ¹³C NMR (101 MHz, Chloroform-*d*) δ 193,27 (C2), 133,06 (A-C1), 132,38 (AA-C2+6), 128,24 (C3a+7a), 127,82 (AA-C3+5), 126,40 (AA-C4), 125,45 (AA-C1), 124,12 (C5+6), 111,25 (C4+7), 105,61 (A-C2), 43,56 (CH₂), 15,67 (CH₃); MS (ESI): m/z 473,1 [M+H]⁺

(1,3-Diethyl-5-methoxybenzimidazol-2-yliden)(2-phenylethynyl)gold(I) (33)



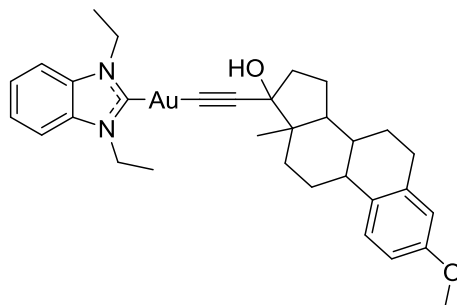
Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-Diethyl-5-methoxybenzimidazol-2-yliden)gold(I) (16) (33,90 mg, 0,08 mmol); Reaktionszeit: 10 min und 60 h; Ausbeute: 16,38 mg (0,03 mmol, 42,0 %); ¹H NMR (400 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,56 – 7,50 (m, 2H, AA-C2+6), 7,33 (dd, $J = 8,8$ und 0,5 Hz, 1H, C7), 7,27 – 7,16 (m, 3H, AA-C3+4+5), 7,01 (dd, $J = 8,9$ und 2,3 Hz, 1H, C6), 6,90 – 6,86 (m, 1H, C4), 4,52 (qd, $J = 7,3$ und 2,0 Hz, 4H, CH₂), 3,89 (s, 3H, C5-M-CH₃), 1,52 (td, $J = 7,3$ und 1,5 Hz, 6H, CH₃);

(1,3-Diethyl-5-fluorbenzimidazol-2-yliden)(2-phenylethynyl)gold(I) (34)



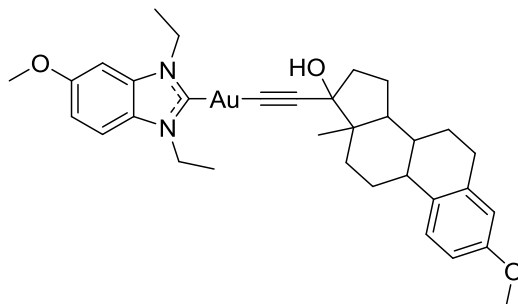
Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-diethyl-5-fluorbenzimidazol-2-yliden)gold(I) (19) (86,6 mg, 0,20 mmol); Reaktionszeit: 8 min und 60 h; Ausbeute: 15,79 mg (0,03 mmol, 16,1 %); ¹H NMR (500 MHz, Chloroform-*d*) δ 7,56 – 7,49 (m, 2H, AA-C2+6), 7,40 (dd, $J = 9,5$ und 4,2 Hz, 1H, C7), 7,28 – 7,22 (m, 2H, AA-C3+5), 7,22 – 7,13 (m, 3H, C4+6 und AA-C4), 4,55 (dq, $J = 15,7$ und 7,3 Hz, 4H, CH₂), 1,54 (td, $J = 7,3$ und 3,3 Hz, 6H, CH₃); ¹³C NMR (126 MHz, Chloroform-*d*) δ 194,92 (C2), 160,27 (d, $J = 244,1$ Hz, C5), 133,61 (d, $J = 12,0$ Hz, A-C1), 132,37 (AA-C2+6), 129,56 (C3a+7a), 127,84 (AA-C3+5), 126,47 (AA-C4), 125,35 (AA-C1), 112,42 (d, $J = 25,7$ Hz, C4/C6/C7), 112,12 (d, $J = 10,2$ Hz, C4/C6/C7), 105,70 (A-C2), 98,43 (d, $J = 27,5$ Hz, C4/C6/C7), 43,84 (C1/3-CH₂), 43,76 (C1/3-CH₂), 15,67 (C1/3-CH₃), 15,50 (C1/3-CH₃); MS (ESI): m/z 490,1 [M]⁺

(1,3-Diethylbenzimidazol-2-yliden)-(3-methoxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -ol-17 α -ethin-2'-yl)gold(I) (35)



Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-diethylbenzimidazol-2-yliden)gold(I) (**14**) (158,20 mg, 0,39 mmol); Reaktionszeit: 10 min und 84 h; Ausbeute: 121,7 mg (0,18 mmol, 45,9 %); hellgelbes glänzendes voluminöses Pulver; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,84 – 7,78 (m, 2H, C5+6), 7,49 – 7,43 (m, 2H, C4+7), 7,22 – 7,15 (m, 1H, M-C1), 6,68 (dd, J = 8,6 und 2,8 Hz, 1H, M-C2), 6,60 (dd, J = 2,9 und 1,0 Hz, 1H, M-C4), 4,78 (s, 1H, M-C17-OH), 4,51 (q, J = 7,2 Hz, 4H, CH₂), 3,69 (s, 3H, M-C3-M-CH₃), 2,78 (s, 2H, M-C6), 2,37 – 2,27 (m, 1H, M-C9), 2,14 – 1,98 (m, 2H, M-C12), 1,90 – 1,70 (m, 5H, M-C11+14+16), 1,43 (t, J = 7,2 Hz, 6H, CH₃), 1,37 – 1,22 (m, 5H, M-C7+8+15), 0,73 (s, 3H, M-C13-CH₃); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 192,51 (C2), 156,88 (M-C3), 137,36 (M-C5), 132,37 (M-C10), 132,22 (M-A-C1), 126,12 (M-C1), 124,03 (C5/6), 123,52 (C3a+7a), 113,30 (M-C4), 111,81 (M-C2), 111,35 (C4/7), 108,37 (M-A-C2), 78,58 (M-C17), 54,75 (M-C3-M-CH₃), 48,64 (M-C14), 46,46 (M-C13), 43,28 (C1+3-CH₂), 42,87 (C9), 39,53 (M-C16), 38,66 (M-C8), 32,75 (M-C12), 29,30 (M-C6), 26,88 (M-C7), 26,19 (M-C11), 22,54 (M-C15), 15,58 (C1+3-CH₃), 12,95 (M-C13-CH₃); [244] Elementaranalyse: C₃₂H₃₉N₂AuO₂ (theoretisch/gemessen [%]): C (56,47/58,97), H (4,12/3,73), N (5,78/5,91); MS (EI): m/z 680,2 [M]⁺, 662,2 [M-H₂]⁺

(1,3-Diethyl-5-methoxybenzimidazol-2-yliden)-(3-methoxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -ol-17 α -ethin-2'-yl)gold(I) (36)



Ligandenaustausch nach Synthese e: Ausgangssubstanz: Chlorido(1,3-Diethyl-5-methoxybenzimidazol-2-yliden)gold(I) (**16**) (152,90 mg, 0,35 mmol); Reaktionszeit: 10 min und 180

84 h; Ausbeute: 42,56 mg (0,06 mmol, 17,1 %); hellgelbes Pulver; ^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ 7,68 (d, J = 9,0 Hz, 1H, C7), 7,35 (d, J = 2,3 Hz, 1H, C4), 7,19 (d, J = 8,5 Hz, 1H, M-C1), 7,05 (dd, J = 8,9 und 2,3 Hz, 1H, C6), 6,71 – 6,65 (m, 1H, M-C2), 6,60 (d, J = 2,8 Hz, 1H, M-C4), 4,77 (s, 1H, M-C17-OH), 4,45 (qd, J = 7,2 und 3,6 Hz, 4H, C1+3-CH₂), 3,85 (s, 3H, C₅-CH₃), 3,69 (d, J = 1,3 Hz, 3H, M-C3-M-CH₃), 2,77 (s, 2H, M-C6), 2,15 – 1,97 (m, 2H, M-C12), 1,91 – 1,71 (m, 5H, M-C11+14+16), 1,41 (td, J = 7,2 und 4,0 Hz, 6H, C1+3-CH₃), 1,37 – 1,14 (m, 5H, M-C17+8+15), 0,74 (s, 3H, M-C13-CH₃); ^{13}C NMR (126 MHz, DMSO- d_6) δ 192,01 (C2), 157,15 (C5), 156,88 (M-C3), 137,35 (M-C5), 133,45 (M-C10), 132,22 (M-A-C1), 126,73 (C3a+7a), 126,12 (M-C1), 113,30 (M-C4), 113,05 (C4/6/7), 112,49 (C4/6/7), 111,36 (M-C2), 108,33 (M-A-C2), 95,31 (C4/6/7), 78,58 (M-17), 55,90 (C₅-M-CH₃), 54,74 (M-C3-M-CH₃), 48,64 (M-C14), 46,46 (M-C13), 43,28 (M-C9), 42,94 (C1/3-CH₂), 42,66 (C1/3-CH₂), 39,53 (M-C16), 38,99 (M-C8), 32,75 (M-C12), 29,30 (M-C6), 26,88 (M-C7), 26,19 (M-C11), 22,54 (M-C15), 15,68 (C1- oder C₃-CH₃), 15,57 (C1- oder C₃-CH₃), 12,95 (M-C13-CH₃); [244] Elementaranalyse: C₃₃H₄₁N₂AuO₃ (theoretisch/gemessen [%]): C (44,89/45,38), H (3,37/3,39), N (5,51/5,55); MS (EI): m/z 710,28 [M]⁺

8.6 Biologische und bioanalytische Methoden

Arbeiten mit humanen Zellen werden unter aseptischen Bedingungen unter einer LAF-Werkbank durchgeführt. Geräte werden autoklaviert und/oder mit Isopropanol 70 % desinfiziert, Lösungen werden autoklaviert. Verbrauchsmaterialien entsprechen dem Laborstandard und stammen von den Firmen Eppendorf, Ranin, Sarstedt und TPP. Die Herstellung der benutzten Lösungen, Puffer, Reagenzien und Medien ist in Teil 8.3 beschrieben. Alle Versuche werden, wenn nicht anders erwähnt, dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Aktivität der Substanzen wird gegen alle in Teil 8.4 bereits beschriebenen humanen Zelllinien getestet. Die weiteren biologischen Untersuchungen werden an der Darmkrebszelllinie HT-29 durchgeführt. Als Lösemittel und Kontrolle dient DMF.

8.6.1 Autoklav-Programme

Feststoffe und Flüssigkeiten werden bei 121 °C (203 kPa) für 20 min autoklaviert.

8.6.2 Gelatinebeschichtung

Die RC-124-Zellen benötigen als Adhäsionshilfe eine Gelatinebeschichtung in den Zellkulturgefäßen. Bei normalen Kulturflaschen (75 cm²) werden unter aseptischen Bedingungen 7,5 ml sterile Gelatinelösung in die Flasche geben und auf dem Boden verteilt. Nach 60 min Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wird der Überstand abgesaugt und einmal mit sterilem PBS gewaschen. Für 96-Well-Platten werden pro Well 30 µl sterile Gelatinelösung verwendet und weiter wie bei den Kulturflaschen verfahren.

Die Beschichtung sollte vor dem Austrocknen geschützt werden, indem z.B. frisches Zellkulturmedium in die Flasche gegeben wird.

8.6.3 Passage

Die kultivierten Zelllinien müssen in regelmäßigen Abständen (im Schnitt ein Mal pro Woche) geteilt und in frisches Medium umgesetzt werden. Wenn der Zellrasen eine Konfluenz zwischen 70 % und 90 % erreicht, ist eine sogenannte Passage nötig (siehe Abbildung 80).

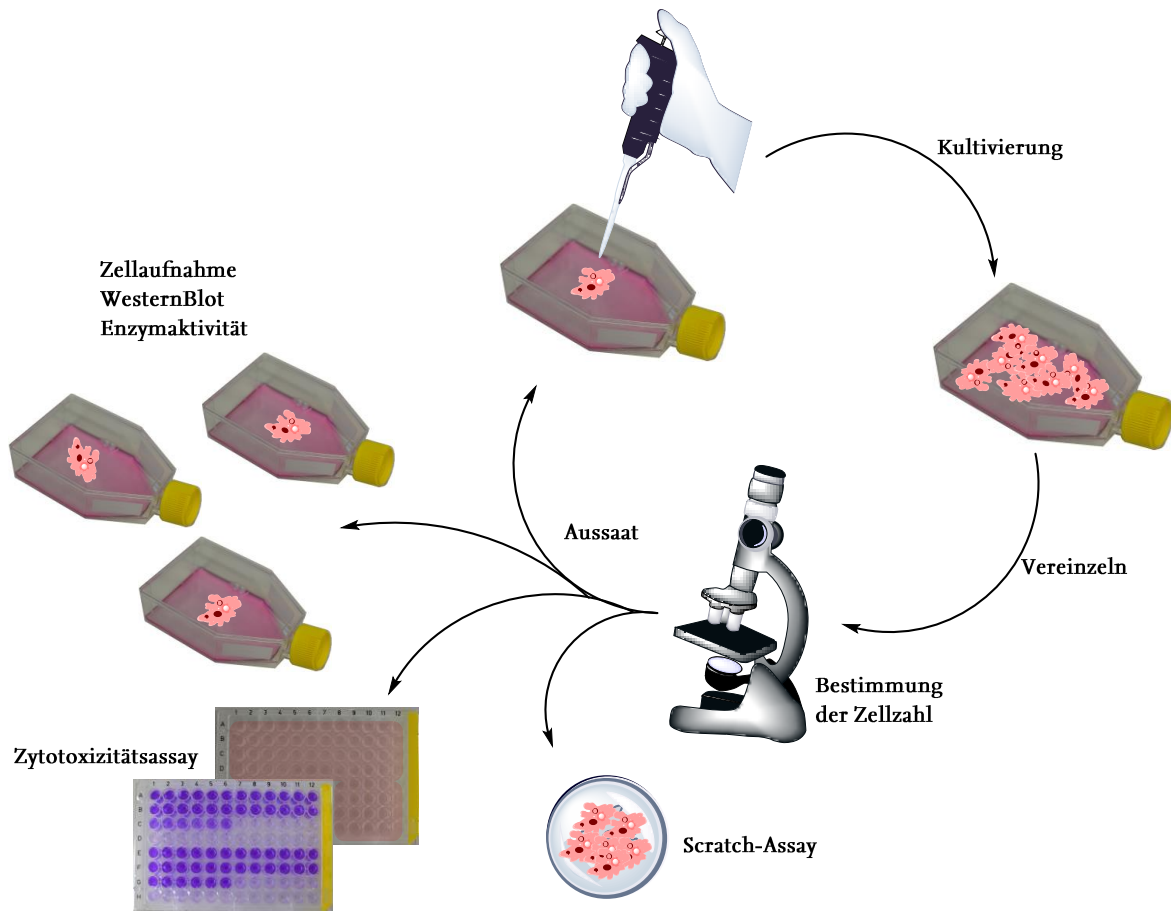


Abbildung 8o Passageabfolge und Nutzung der Zellen

Hierbei wird das alte Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml sterilem PBS gewaschen, um Abbauprodukte, abgestorbene Zellen und Mediumreste zu entfernen. Das PBS wird abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Trypsin-Lsg. versetzt. Trypsin ist ein Gemisch aus Verdauungsenzymen, das die Zell-Zell- und Gefäßkontakte lockert und durch zweiwertige Ionen inhibiert werden kann. Das Trypsin wird abgesaugt und die Kultur im Brutschrank bei 37 °C für 2 bis 4 min inkubiert. Ein zu langes Inkubieren mit Trypsin-Lsg. kann die Zellmembran angreifen, sodass dies vermieden werden muss. Der Zellrasen wird dann mit 10 ml frischem Medium (Inhibition des restlichen Trypsins) von der Kulturflasche gewaschen und die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt werden. Manche adhärente Zellen müssen vor dem Vereinzeln zusätzlich mit einem Zellschaber von der Kulturflasche gelockert werden. Die so entstandene Zellsuspension ist nach Bestimmung der Zellzahl Ausgangsmaterial für verschiedene Versuche.

Für die Passage wird ein Aliquot der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche mit 10 ml frischem Medium überführt und gut verteilt. Die Menge der Zellsuspension ist von der Zelllinie

und dem aktuellen Wachstum abhängig und wird wöchentlich angepasst. Die Zellen können bis zur nächsten Passage im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert werden.

8.6.4 Viabilitätstest

Der Viabilitätstest gibt Informationen darüber, wie hoch der Anteil an lebensfähigen bzw. toten Zellen innerhalb der Zellkultur ist. Er ist somit ein Maß für die Güte der Kultur. Er wird regelmäßig mit den kultivierten Zellen durchgeführt.

Für den Test werden 0,1 ml Zellsuspension mit 3,6 ml PBS und 2,7 ml Trypan-Blue-Lösung 0,5 % vorsichtig mit der Pipette durchmischt und 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach nochmaligem Durchmischen wird die Zellsuspension sofort in eine Zellzählkammer pipettiert und die blauen und farblosen Zellen werden gezählt. Blau und leicht blau gefärbte Zellen gelten als tot und ungefärbte als lebendig. Trypan-Blau kann durch perforierte Zellmembranen von toten Zellen dringen und diese anfärben. In lebendigen Zellen passiert dies durch Diffusion nur in sehr geringem Maß. Die Vitalität wird prozentual berechnet (Anteil der lebendigen Zellen pro Gesamtzellzahl) und gilt über 80 % als gut und unter 50 % als schlecht.

8.6.5 Einfrieren

Nach Neukauf von Zelllinien wird bei ausreichendem Wachstum eine Kryokultur dieser angelegt, um bei Bedarf eine frische Charge auftauen zu können.

Wenn die neuen Zellen in den normalen Passagezyklus übergehen, wird die Ausgangsflasche in mehrere neue Flaschen gesplittet. Diese kultiviert man bis zu einem Monolayer kurz vor Konfluenz (85-95 %). Die Zellen werden abgekratzt, in ein Zentrifugenröhrchen überführt, ein Zellpellet abzentrifugiert (5 min, 722 g, 3000 U/min) und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wird in 1,8 ml des Einfriermediums resuspendiert und maximal 1,8 ml dieser Zellsuspension jeweils in ein Kryoröhrchen verteilt. Die Kryoröhrchen werden 15 min im Kühlschrank abgekühlt, dann 2 bis 4 h bei -20 °C eingefroren und ü.N. in der Gasphase eines Stickstoffbehälters gelagert (ca. -150 °C), bis sie dauerhaft bei -196 °C in flüssigem Stickstoff gelagert werden.

8.6.6 Auftauen

Die Kryoröhrchen werden schnell bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, bis das Eis gerade vollständig geschmolzen ist. 10 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium werden in 15 ml Tubes vorgelegt, die geschmolzene Zellsuspension schnell in das Tube überführt und leicht durchmischt. Die Suspension wird zentrifugiert (5 min, 722 g, 3000 U/min), der Überstand dekantiert, das Zellpellet in 10 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium resuspendiert und in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt. Die Zellen können nun im Brutschrank anwachsen, wobei sie 12 h komplett in Ruhe gelassen werden sollten.

8.6.7 Aussäen

Die Aussaat dient als Vorbereitung für die Untersuchung der Zytotoxizität. Hierbei werden 96-Loch-Platten mit einer definierten Zellanzahl kultiviert, die dann mit einer zu testenden Substanz inkubiert werden können.

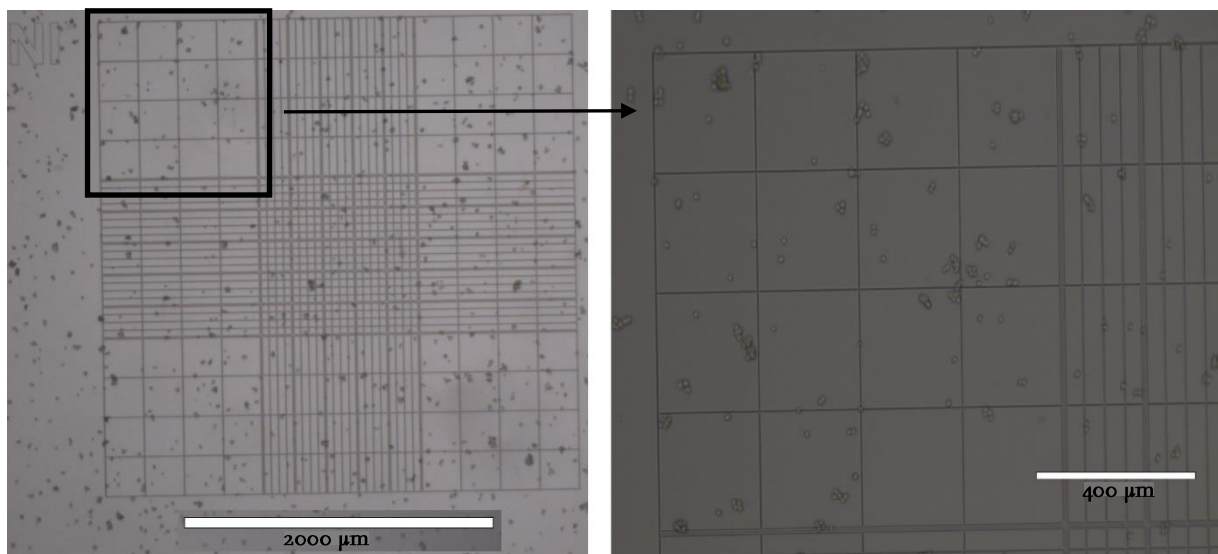


Abbildung 81 C-Chip mit Neubauer improved Zählkammer mit HT-29-Zellen, links: gesamtes Zählkreuz, rechts: linkes oberes Quadrat reingezoomt

Aus der, bei der Passage hergestellten, Zellsuspension wird ein Aliquot genommen und davon 10 µl in einen C-Chip (Neubauer improved Zählkammer, Abbildung 81) pipettiert. Am Mikroskop wird das Zählkreuz scharf gestellt, die vier äußeren Eckquadrate (geeignet für Säugerzellen) ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl ergibt sich so pro 0,1 µl Zellsuspension. Durch wöchentliches Feedback (Absorptionskontrolle) aus dem

Zytotoxizitätstest wird die nötige Zellmenge immer wieder kontrolliert und angepasst. Die durchschnittliche Zellzahl ist unter 8.4 vermerkt. Die benötigte hochgerechnete Menge an Zellsuspension wird mit der nötigen Menge frischem Medium gemischt und 100 µl dieser Mischung in jedes Loch einer 96-Loch-Platte gegeben. Die Platten werden 48 h (HT-29, schnellerer Teilungszyklus) bzw. 72 h (MCF-7, MDA-MB-231 und RC-124) im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und können dann für den Zytotoxizitätstest genutzt werden.

8.6.8 Zytotoxizitäts- bzw. Antiproliferations-test

Stammlösungen der zu testenden Substanzen werden zu 100 mM, 50 mM, 20 mM oder 10 mM in DMF gelöst und daraus wie folgt weitere Lösungen hergestellt:

c [mM]	100	50	20	10	4	1	0,2
µl (mM Lösung)	-	10 (100)	10 (100)	10 (20)	10 (20)	10 (4)	10 (1)
+ µl DMF	berechnet	10	40	10	40	30	40
c [mM]	50	25	20	10	4	1	0,2
µl (mM Lösung)	-	10 (50)	20 (50)	10 (20)	10 (20)	10 (4)	10 (1)
+ µl DMF	berechnet	10	30	10	40	30	40
c [mM]	20	10	4	2	1	0,5	0,2
µl (mM Lösung)	-	10 (20)	10 (20)	10 (4)	10 (4)	10 (1)	10 (1)
+ µl DMF	berechnet	10	40	10	30	10	40
c [mM]	10	5	2,5	1	0,5	0,25	0,1
µl (mM Lösung)	-	10 (10)	10 (10)	10 (2,5)	10 (2,5)	10 (0,5)	10 (0,5)
+ µl DMF	berechnet	10	30	15	40	10	40

Tabelle 36 Verdünnungsschema der Konzentrationsreihe für die Untersuchung der antiproliferativen und zytotoxischen Effekte

Pro Testlauf wird eine Verdünnungsreihe ausgesucht. Falls der IC₅₀-Wert eine andere Verdünnungsreihe erfordert, wird diese an die Substanz angepasst.

Während des Assays werden jeweils 2,0 µl der jeweiligen Stammlösung (DMF) unter aseptischen Bedingungen zu 2,0 ml Zellkulturmedium gegeben und gut durchmischt. Dieser Schritt führt zu einer 1000-fachen Verdünnung aus dem mM- in einen µM-Bereich. Das alte Zellkulturmedium von 6 Löchern der 96-Well-Platte wird abgesaugt und durch 200 µl des neuen Mediums ersetzt. Die Kontrolle ist hierbei eine Mischung aus Lösemittel und Medium, die nach dem gleichen Verhältnis gemischt wird.

Die Belegung der Platte geschieht wie folgt:

	1-6	7-12
A	Kontrolle	Substanz 1 - 0,2 μ M
B	Substanz 1 - 1 μ M	Substanz 1 - 4 μ M
C	Substanz 1 - 10 μ M	Substanz 1 - 20 μ M
D	Substanz 1 - 50 μ M	Substanz 1 - 100 μ M
E	Kontrolle	Substanz 2 - 0,2 μ M
F	Substanz 2 - 1 μ M	Substanz 2 - 4 μ M
G	Substanz 2 - 10 μ M	Substanz 2 - 20 μ M
H	Substanz 2 - 50 μ M	Substanz 2 - 100 μ M

Tabelle 37 Plattenbelegung für die Untersuchung antiproliferativer und zytotoxischer Effekte

Anschließend wird die Platte weiter im Brutschrank inkubiert. Die to-Platte (für jede Zelllinie jeweils eine Platte) wird im besten Fall zeitlich genau in der Mitte des gesamten Assays abgestoppt (siehe unten) und mit PBS im Kühlschrank gelagert.

Nach 72 (HT-29) oder 96 Stunden (MCF-7, MDA, RC-124) wird das Zellkulturmedium der 96-Well-Platten abgesaugt und die Platten abgestoppt. Hierfür werden 100 μ l verd. Glutaraldehydlösung zur Fixierung der lebenden Zellen in jedes Loch der Platte gegeben und diese nach 20-30 Minuten wieder abgeschüttet. Während der Fixierung bildet Glutaraldehyd mit den Aminogruppen der Zellmembranproteine in neutralem wässrigen Medium durch eine nukleophile Substitution polymere Iminstrukturen. Jedes Loch wird mit 180 μ l PBS gewaschen und dieses wieder abgesaugt oder die Platten mit PBS im Kühlschrank gelagert.

Die to-Platten und die Testplatten können nun angefärbt werden. Hierfür wird Kristallviolett verwendet, was die fixierten Zellen durch Einlagerung in Chromatin anfärben kann. 100 μ l Kristallviolettlösung werden in jedes Well der Platten gegeben und diese 30 min stehen gelassen. Das Kristallviolett wird abgeschüttelt, die Platten werden zweimal mit Leitungswasser gewaschen und 15 min mit Leitungswasser stehen gelassen. Das Wasser wird durch Abklopfen auf Papiertüchern entfernt. Anschließend werden 180 μ l EtOH 70% (V/V) zugesetzt und die Platten 2 - 4 h bei leichtem Schütteln stehen gelassen. Die Absorptionsmessung erfolgt bei 590 nm im Mikroplattenreader. Um eine Linearität der Absorption zur Konzentration zu gewährleisten, sollte die Absorption unter 2,4 liegen, was im Normalfall bei einer Konfluenz von maximal 75 % gewährleistet ist.

Aus der sechsfachen Absorptionsbestimmung wird der Mittelwert berechnet. Für die to-Platte wird der Mittelwert aus der gesamten Platte ermittelt. Die to-Platte drückt den Startzustand aus und wird von allen anderen Werten abgezogen. Die Lösemittelkontrolle entspricht dem

unbeeinflussten Wachstum und wird als 100 % gesehen. Somit definiert sich der Anteil des Wachstums wie folgt:

$$W = 100 * (S - t_0) / (K - t_0)$$

W = Anteil Wachstum der jeweiligen Verdünnung

S = Absorptionsmittelwert der jeweiligen Verdünnung

K = Absorptionsmittelwert der Kontrolle (Lösemittel)

t₀ = Mittelwert der t₀-Platte (gesamte Platte)

Die Konzentrationen werden mit den dazugehörigen Anteilen graphisch in dem Analyse- und Datenprogramm Origin (ADDITIVE Soft- und Hardware für Technik und Wissenschaft GmbH, Friedrichsdorf) durch einen sigmoidalen Fit in einer Kurve (Boltzmann oder Hill 1) angenähert. Der IC₅₀-Wert ergibt sich als W = 50 % aus der ermittelten Kurve und drückt somit aus, bei welcher Konzentration die Biomasse 50 % der Kontrolle aufweist.

8.6.9 Wachstumsratenbestimmung

Der Einfluss von Testsubstanzen auf verschiedene Zellen kann ebenfalls visuell ermittelt werden. Veränderungen in der Morphologie oder das Wachstumsverhalten können mittels sogenanntem Hellfeld-Live-Cell-Imaging untersucht werden. Hierfür wird die Zielzelllinie unter Substanzeinfluss mittels Mikroskop im Inkubator beobachtet.

Für die Untersuchung der Wachstumsraten werden zwei Kulturflaschen mit 10 ml Zellkulturmedium und 0,5 bis 0,8 µl Zellsuspension der HT-29-Zellen versehen. Diese werden bis zu einer Konfluenz von ca. 30 % kultiviert, mit PBS gewaschen und mit 10 ml frischem Medium versetzt. Als Kontrolle dienen 10 µl DMF in der ersten Flasche. 10 µl der Testsubstanz mit einer Konzentration von 5 mM werden in die zweite Flasche gegeben, wodurch sich eine Endkonzentration von 5 µM ergibt. Die Flaschen werden innerhalb eines Inkubators unter jeweils eine Kamera des JuLI^{Br}-Imager platziert, die Zellen fokussiert und Helligkeit und Kontrast so eingestellt, dass das Gerät die Konfluenz passend bestimmt. Die Zellen werden für 96 h inkubiert, halbstündlich wird ein Bild aufgezeichnet und die Konfluenz berechnet. Aus diesen Daten ergibt sich die normale Wachstumskurve für die Kontrolle und die von der Testsubstanz beeinflusste Wachstumskurve im Vergleich.

8.6.10 Scratch-Assay

Der Einfluss auf die Migrationsrate von Zellen wird mittels Scratch-Assay bestimmt. Hierfür eignen sich MDA-MB-231 Zellen von den vorliegenden Zelllinien am besten. Für den Assay wird in einer Petrischale ein konfluenten Zellrasen kultiviert, das Medium abgesaugt und einmal mit PBS gewaschen. Mit einer sterilen Pasteurpipette wird eine Linie durch den Zellrasen gekratzt und die Petrischale mit 3 ml frischem Medium versetzt. Zu dem Medium kommt entweder DMF als Referenz oder die jeweilige Testsubstanz mit dem IC_{50} -Wert als Testkonzentration. Innerhalb der ersten 8 Stunden wird jede Stunde ein Foto aufgenommen und nach 24 Stunden ein abschließendes Bild. Die Auswertung erfolgt grafisch. Dabei wird die Länge des Kratzers über die Zeit bestimmt und die Ergebnisse werden prozentual zum komplett geschlossenen Zustand angegeben.

8.6.11 Zellaufnahme

Die Aufnahme der Substanzen in Zellen wird aus Gründen der Vergleichbarkeit verschiedener Assays mit der Zelllinie HT-29 durchgeführt. Die Zellen werden mit den Substanzen entweder im IC_{50} -Bereich, bei 1 μ M, 3 μ M bzw. 5 μ M inkubiert und dabei die zeitabhängige Aufnahme untersucht. Die Größe der Kulturflaschen hängt von den zu bestimmenden Metallen und der Zellaufnahme ab. Die NHC-Au(I)-Alkine und Phosphan-Au(I)-Alkine konnten in normalen Flaschen (75 cm³) untersucht werden, für die fluorenthaltenden Substanzen mussten jedoch große Kulturflaschen (150 cm³) genutzt werden, um mehr Zellmasse zu produzieren.

Die gewünschte Menge Flaschen wird im Vorfeld bis zu einer Konfluenz von 70-90 % angezüchtet. Eine Stammlösung der zu testenden Substanz (1000-fach höher konzentriert als die Testkonzentration) wird unter aseptischen Bedingungen mit Medium gemischt. Das alte Medium wird aus der Zellkulturflasche entfernt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Das neue Medium, welches die Testsubstanz enthält, wird auf die Zellen gegeben und für die gewünschte Zeit im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Für jeden Zeitpunkt, den man untersuchen möchte, wird eine Flasche benötigt. Nach der Inkubation wird das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Danach wird frisches PBS auf den Zellrasen gegeben, dieser mit einem Zellschaber abgekratzt, die Zellsuspension über auf- und ab-Pipettieren vereinzelt und in

15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Diese werden 5 min bei 3500 U/min (983 g) zentrifugiert und der Überstand danach dekantiert.

Das Zellpellet kann bis zur weiteren Analytik bei -20 °C aufbewahrt werden. Vor der Analytik wird das Zellpellet in 0,5 ml rH₂O resuspendiert und für 30 min bei 30 °C im Ultraschallbad lysiert. Die Proteinkonzentration des Zellpellets wird mittels Bradford-Bestimmung ermittelt und die Metallkonzentration mit der passenden Methode der HR-CS AAS gemessen.

8.6.12 Proteingehaltsmessung mittels Bradford-Bestimmung

Für die Zellaufnahme und verschiedene Untersuchungen am Zelllysate müssen die jeweiligen Proben auf eine definierte Proteinmenge eingestellt werden, um eine Vergleichbarkeit der Durchgänge und Substanzen zu gewährleisten. Den Proteingehalt kann man mittels Bradford-Bestimmung ermitteln, da der enthaltene Farbstoff Coomassie Blau G-250 in saurem Milieu mit kationischen und nicht-polaren Aminosäureseitenketten einen Komplex eingeht. Das Absorptionsmaximum des Komplexes liegt bei 590 nm, sodass ein linearer Zusammenhang nach Lambert-Beer zwischen Absorption und Konzentration vorliegt.

Für die Bestimmung wird die Bradfordstammlösung an RT angepasst (von -20 °C) und 1 Teil mit 4 Teilen dH₂O verdünnt. Eine BSA-Lsg. wird mit einer Massenkonzentration von 1 mg/mL (in dH₂O) hergestellt und die folgende Verdünnungsreihe pipettiert:

BSA (µg/ml)	µl (Verdünnung)	µl dH ₂ O
0	-	100
1	10 µl (von 10 µg/ml)	90
10	10 µl (von 100 µg/ml)	90
25	25 µl (von 100 µg/ml)	75
50	50 µl (von 100 µg/ml)	50
75	75 µl (von 100 µg/ml)	25
100	100 µl (von 1000 µg/ml)	900
250	25 µl (von 1000 µg/ml)	75
300	30 µl (von 1000 µg/ml)	70
500	50 µl (von 1000 µg/ml)	50
750	75 µl (von 1000 µg/ml)	25
1000	-	1000

Tabelle 38 Verdünnungsreihe der BSA-Kalibrierlösungen für Proteinbestimmungen

Auf Erfahrung basierend werden Aliquote der Proben aus normalen Flaschen 1 zu 20 mit dH₂O verdünnt, um innerhalb eines linearen Absorptionsbereiches von ca. 0,2 bis 0,7 zu liegen. Proben aus großen Flaschen können 1 zu 50 mit dH₂O verdünnt werden. 20 µl der verdünnten Probe

bzw. Kalibrierlösung werden in eine 96-Well-Platte pipettiert und dann zügig mit 200 μ l Bradford-Reagenz gemischt. Jede Probe und Kalibrierlösung wird als Doppelbestimmung aufgetragen. Blasenbildung sollte vermieden werden bzw. müssen entstandene Blasen vorsichtig entfernt werden. Die Platte wird für 30 Minuten auf einem Plattenschüttler inkubiert und die Absorption im Mikropplattenreader bei 595 nm gemessen.

Zur Auswertung werden die Mittelwerte aus jeder Doppelbestimmung berechnet und die Absorption gegen die Konzentration der Kalibrierlösung aufgetragen. Durch lineare Regression kann die Geradengleichung ermittelt werden, wobei der Korrelationskoeffizient (r^2) größer als 0,99 sein sollte. Mit der ermittelten Geradengleichung kann der Proteingehalt der vermessenen Proben als x berechnet werden. Die 1 zu 20 bzw. 1 zu 50 Verdünnungen werden zum Schluss wieder einberechnet, um den tatsächlichen Proteingehalt der Probe in mg/ml zu erhalten.

8.6.13 Proteininteraktion/Proteinbindung

Während der Inkubation von Testsubstanzen mit Zellen haben die Proteine des Zellkulturmediums Einfluss auf die Aufnahme und Aktivität der Komplexe. Um diesen Einfluss zu untersuchen, kann die Bindung der Substanzen an verschiedenen Proteine untersucht werden. Die Interaktion mit dem gesamten FCS und mit isoliertem Serumalbumin ist hierbei interessant und wurde mittels Ethanolpräzipitation durchgeführt.

Für den Versuch wird DMEM mit einer definierten Menge FCS (FCS-DMEM-Lsg.) bzw. mit BSA (BSA-DMEM-Lsg.) versetzt und es werden alle anderen Supplemente weggelassen. Für den Matrixabgleich wird aus der jeweiligen DMEM-Lsg. jeweils 1,0 ml als Aliquot gezogen und wie die Substanzproben behandelt. Die zu untersuchende Substanz wird mit einer Konzentration von 3 mM oder 5 mM in DMF gelöst und 10 μ l dieser Lösung in 10 ml der jeweiligen DMEM-Lsg. pipettiert, um eine Endkonzentration von 3 μ M bzw. 5 μ M zu erhalten.

Diese Lösungen werden unter leichtem Schwenken bei 37 °C inkubiert und zeitabhängig Aliquote (250 μ l) zu den Zeitpunkten 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 16, 24 und 32 h gezogen. Das Aliquot wird direkt mit 500 μ l gekühltem absoluten Ethanol (-20 °C) versetzt, einmal geschwenkt und für zwei Stunden bei -20 °C zu Proteinausfällung aufbewahrt. [245] Anschließend werden die ausgefällten Proteine bei 4 °C und 4800 U/min (2189 g) 10 min abzentrifugiert. 400 μ l des Überstandes werden entnommen und können bis zur Gehaltsmessung mittels HR-CS AAS bei -20 °C aufbewahrt werden.

Für die Goldbestimmung werden zu 100 µl Überstand jeweils 10 µl Salpetersäure (13 %), Ascorbinsäure-Lsg. (1 %, m/V) und Triton®-x100-Lsg. (1 %, V/V) pipettiert und nach der unter Kapitel 8.6.14 beschriebenen Methode für Gold mittels HR-CS AAS vermessen. Die erhaltenen Goldgehalte entsprechen dem ungebundenen Metallanteil und müssen noch auf den Gehalt gebunden an Protein zurückgerechnet werden. Der Anteil des gebundenen Metalls wird unter Berücksichtigung der assay-bedingten Verdünnungen wie folgt berechnet werden:

$$G = (A - U \cdot 3) / A \cdot 100$$

G = gebundener Goldanteil [%]

A = Ausgangskonzentration Gold [µM]

U = ungebundener Goldgehalt [µM]

8.6.14 Quantifizierung des Metallgehalts mittels HR-CS AAS bzw. MAS

Der Metallgehalt von Gold und Fluor in den verschiedenen Proben wird mittels Atomabsorptionsspektrometrie (AAS) bzw. Molekülabsorptionsspektrometrie (MAS) ermittelt. Die Messungen werden am contrAA 700 Hochauflösungskontinuumsstrahleratomabsorptionsspektrometer (HR-CS AAS) von Analytik Jena durchgeführt.

Die Absorptionen können anhand von Kalibriergleichungen in den Metallgehalt umgerechnet werden. Kalibrierreihen werden mit der entsprechenden Testsubstanz gelöst in DMF mit Matrix hergestellt, um Beeinflussung der Messung durch Matrixbestandteile einzubeziehen. Die Matrix für die Kalibrierlösungen und die Proben werden zur Vergleichbarkeit mit rH₂O auf eine definierte Proteinkonzentration eingestellt (meist 1,0 mg/ml).

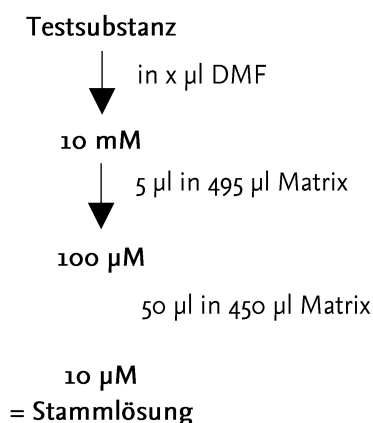


Abbildung 82 Vorgehensweise zu Verdünnung der Metallstammlösung zu Kalibrierung

Für die Kalibrierlösungen wird die Testsubstanz eingewogen und zu einer Konzentration von 10 mM in DMF gelöst. Die Lösung wird in zwei Verdünnungsschritten mit Matrix bis auf eine Konzentration von 10 μ M verdünnt (= Stammlösung) (siehe Abbildung 82).

Aus dieser Stammlösung werden anhand von Tabelle 39 die benötigten Kalibrierlösungen hergestellt.

Konzentration [μ M]	10	9	8	6	4	2	1	0,5	0,25	0,05	0
Stammlösung [μ l]	100	90	80	60	40	20	10	5	2,5	0,5	0
Matrix [μ l]	0	10	20	40	60	80	90	95	97,5	99,5	100

Tabelle 39 Herstellung der Kalibrierlösungen

Die drei verwendeten Methoden bzw. Ofenprogramme wurden von Dr. Claudia Schmidt im Arbeitskreis etabliert, angepasst oder mit ihrer Hilfe entwickelt. Bei allen Ergebnissen wird der Mittelwert aus drei einzelnen Messungen bestimmt. Gold wird bei einer Wellenlänge von 242,795 nm und Fluor als Galliummonofluorid bei einer Wellenlänge von 211,248 nm bestimmt. Der Metallgehalt wird in nmol Metall pro mg Zellprotein angegeben.

Gold

Zu 100 μ l Probe bzw. Kalibrierlösung werden jeweils 10 μ l Triton®-x100-Lsg. (1 % V/V) und Ascorbinsäure (1 % m/V) pipettiert und je Messung 25 μ l Lösungen in einem beschichteten Standardgraphitrohr von Analytik Jena mit folgendem Ofenprogramm vermessen (Tabelle 40):

Phase	Temperatur [°C]	Heizrate [°C/s]	Haltezeit [s]	Gasspülung
Trocknen	80	8	20	Maximal
Trocknen	90	3	20	Maximal
Trocknen	110	5	10	Maximal
Trocknen	350	50	15	Maximal
Pyrolyse	700	200	20	Maximal
Gasanpassung	700	0	5	Angehalten
Atomisierung	1850	1500	6	Angehalten
Ausheizen	2550	500	6	Maximal

Tabelle 40 Temperaturprogramm für Goldmessung

Gold in Nanoemulsion

Die mit Goldkomplexen beladenen Nanoemulsionen müssen wegen ihres hohen Fettanteils vor der Vermessung mit rH₂O 1 zu 99 verdünnt werden. Diese Verdünnung wird am Ende der Berechnung wieder einbezogen. Die Probenvorbereitung erfolgt weitestgehend parallel zur Goldmethode. Das Ofenprogramm wird an die besondere Beschaffenheit der Proben angepasst (siehe 6.2), die eine sehr langsame Trocknung fordert (Tabelle 41):

Phase	Temperatur [°C]	Heizrate [°C/s]	Haltezeit [s]	Gasspülung
Trocknen	80	8	20	Maximal
Trocknen	90	3	50	Maximal
Trocknen	95	5	50	Maximal
Trocknen	100	5	20	Maximal
Trocknen	350	50	15	Maximal
Pyrolyse	700	200	20	Maximal
Gasanpassung	700	0	5	Angehalten
Atomisierung	1850	1500	6	Angehalten
Ausheizen	2550	500	6	Angehalten

Tabelle 41 Angepasstes Ofenprogramm zu Goldvermessung in Nanoemulsionen

Fluor

Fluor wird als Galliummonofluorid mittels HR-CS MAS bestimmt. Das Standardgrafitrohr wird mit einer 0,05 mm dicken Tantalfolie beschichtet. Zu 100 µl Probe werden 10 µl Triton®-x100-Lsg. (1 %) pipettiert und je 20 µl Analysenlösung pro Einzelmessung in das Grafitrohr injiziert. Die Galliumnitrat-Lsg. wird während des Ofenprogramms (Tabelle 42) mittels Autosampler in den Ofen injiziert.

Phase	Temperatur [°C]	Heizrate [°C/s]	Haltezeit [s]	Gasspülung	Modifier Ga (NO ₃) ₃
Trocknen	120	30	5	maximal	2 µl 5,0 g/l
Kühlen	80	-	1	maximal	
Trocknen	90	6	45	maximal	5 µl 7,5 g/l
Trocknen	120	6	20	maximal	
Trocknen	300	20	3	maximal	
Pyrolyse	520	200	10	maximal	
Gasanpassung	520	0	5	angehalten	
Vaporisierung	1200	800	7	angehalten	
Ausheizen	2500	1000	4	maximal	

Tabelle 42 Ofenprogramm für Fluormessungen

8.6.15 TrxR-Inhibitionstest

Die Inhibition der TrxR-Aktivität wird am isolierten Enzym ermittelt. Hierfür wird ein käuflich erworbenes Enzym aus murinen Hepatozyten mit der zu testenden Substanz inkubiert und die Restaktivität des Enzyms getestet. Die TrxR wird bei -20 °C gelagert und für den Versuch frisch mit dH₂O auf eine Konzentration von 3 bis 5 U/ml verdünnt. Aus der Testsubstanz wird ähnlich der Bestimmung der Zytotoxizität eine Verdünnungsreihe in DMF hergestellt, diese muss eine 200-fach höhere Konzentration haben als die Zielkonzentration (0,001 bis 100 µM). 10 µl der Stammlösungen der Testsubstanz sowie eines DMF-Blanks werden mit 990 µl

Kaliumphosphatpuffer verdünnt. Die Testlösungen werden mit Blank, Positiv- und Negativkontrolle nach folgendem Schema in eine 96-Well-Platte pipettiert:

Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Probe	Blank	Positiv Kontrolle	Negativ Kontrolle	0,001 μM	0,01 μM	0,1 μM	1,0 μM	10 μM	100 μM
Puffer	25 μl	-	25 μl	-	-	-	-	-	-
Testlösung	-	-	25 μl (100 μM)	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl
Blanklösung	25 μl	25 μl	-	-	-	-	-	-	-
Enzymlösung	-	25 μl	-	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl	25 μl

Tabelle 43 Pipettierschema für TrxR-Inhibitionsassay

Wenn nötig, kann die Verdünnungsreihe angepasst und die Testanzahl auf neun Konzentrationen erhöht werden. Die Enzymlösung wird als letztes dazugegeben und die Platte bei 37 °C und leichtem Schütteln für 75 min inkubiert. Der Reaktionsmix wird nach der Vorschrift in Kapitel 8.3 hergestellt und bei 37 °C warm gehalten. Nach der Inkubation werden zu jeder Probe 225 μl warmer Reaktionsmix gegeben und die Enzymreaktion mit der Zugabe von 25 μl DTNB-Lsg. gestartet. Die Platte wird sofort in den auf 37 °C vorgeheizten Mikroplattenreader gestellt und die Messung gestartet. Die Absorption wird dabei 10 Mal in einem Intervall von 35 sec bei 405 nm gemessen. Aktive TrxR kann durch Spaltung einer Disulfidbindung des DTNBs in zwei Moleküle TNB nachgewiesen werden, da TNB im Bereich von 405 nm absorbiert und somit photometrisch gemessen werden kann. [246]

Die Negativkontrolle darf für eine korrekte Auswertung nur minimal von dem Blank abweichen. Die Positivkontrolle muss als Aktivitätskontrolle des Enzyms eine deutliche Steigung zeigen. Die IC₅₀-Werte der Substanzen lassen sich nach Abzug des Blanks über den Anteil der Steigung an der Positivkontrolle und einem sigmoidalen Fit entsprechend der Zytotoxizitätsberechnung bestimmen.

8.6.16 Proteingelelektrophorese

Die Untersuchung von Proteingemischen erfolgt mittels diskontinuierlicher Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE), die auf einem Tris-Glycin-System basiert. Das Proteingemisch wird dabei in einem elektrischen Feld nach Größe und Gesamtladung der Proteine aufgetrennt. Der Ablauf des Versuchs wird in Abbildung 83 dargestellt.

Die Gele für die SDS-PAGE werden mindestens einen Tag vor dem jeweiligen Versuch gegossen. Die Konzentration des Sammelgels beträgt 6 %, das Trenngel hat für die Untersuchung der TrxR (ca. 65 kDa) eine Konzentration von 12 %.

Die Gießstände werden nach den gerätespezifischen Anweisungen aufgebaut, wobei die Dichtigkeit der Kammern mit einer kleinen Menge Trenngel-Lsg. getestet wird. Das Trenngel wird bis zur unteren Kante der Halterung gegossen und mit Isopropanol 70 % überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erhalten. Nach abgeschlossener Polymerisierung wird das Isopropanol abgegossen und das Sammelgel wird bis zur oberen Kante in die Kammer pipettiert. Der Kamm wird vorsichtig eingesetzt und das Gel bis zur vollständigen Polymerisierung in den Gießständen gelassen. Für die Lagerung werden die Gele in angefeuchtetes Papier gewickelt und in einer Plastiktüte im Kühlschrank aufbewahrt.

Für die Gelentwicklung wird ein Gel in die Entwicklungskammer eingehängt und mit 1x Laufpuffer die Dichtigkeit geprüft. Die Kammer wird je nach Gelanzahl bis zur entsprechenden Markierung mit 1x Laufpuffer gefüllt, der Kamm vorsichtig aus dem Gel gezogen und die Taschen mit 1x Laufpuffer ausgespült.

Der Proteingehalt der zu untersuchenden Proben wird mittels Bradfordbestimmung ermittelt (siehe 8.6.12). Die Proben werden auf eine gewünschte Proteinmenge (30-60 µg) eingestellt, im Verhältnis 3 zu 1 mit 4x SDS-Gelladepuffer gemischt, für 10 min auf 70 °C erhitzt und vor dem Beladen des Gels kurz abzentrifugiert. Die Proben und der Proteinmarker werden mit einer Hamilton Spritze in die Geltaschen überführt und die Gelkammer fertig vorbereitet.

Das Sammelgel wird bei 60 V 15 min entwickelt, das Trenngel kann entweder langsam bei 20 V für ca. 1,5 h oder schnell bei 150 V innerhalb einer Stunde entwickelt werden. Die schnelle Variante erzeugt eine rasche Wärmeentwicklung, sodass der Puffer evtl. nachgefüllt werden muss. Sobald der blaue Frontmaker aus dem Gel gelaufen ist, kann die Entwicklung beendet werden.

Die Kammer wird wieder abgebaut und das Sammelgel vom Trenngel entfernt. Das Gel kann jetzt auf eine geeignete Membran übertragen werden, um das Zielprotein TrxR immunologisch nachweisen zu können (siehe 8.6.17).

Nach Übertragung auf die PVDF-Membran des Versuchs wird das Gel einer Coomassie-Färbung unterzogen, um die gleichmäßige Beladung des Gels zu kontrollieren. Hierfür wird das Gel ü.N. in kolloidaler Coomassie-Lsg. aufbewahrt und im Anschluss so lange mit dH₂O gewaschen, bis die Hintergrundfärbung des Gels verblasst und das Gel fotografiert werden kann. [247]

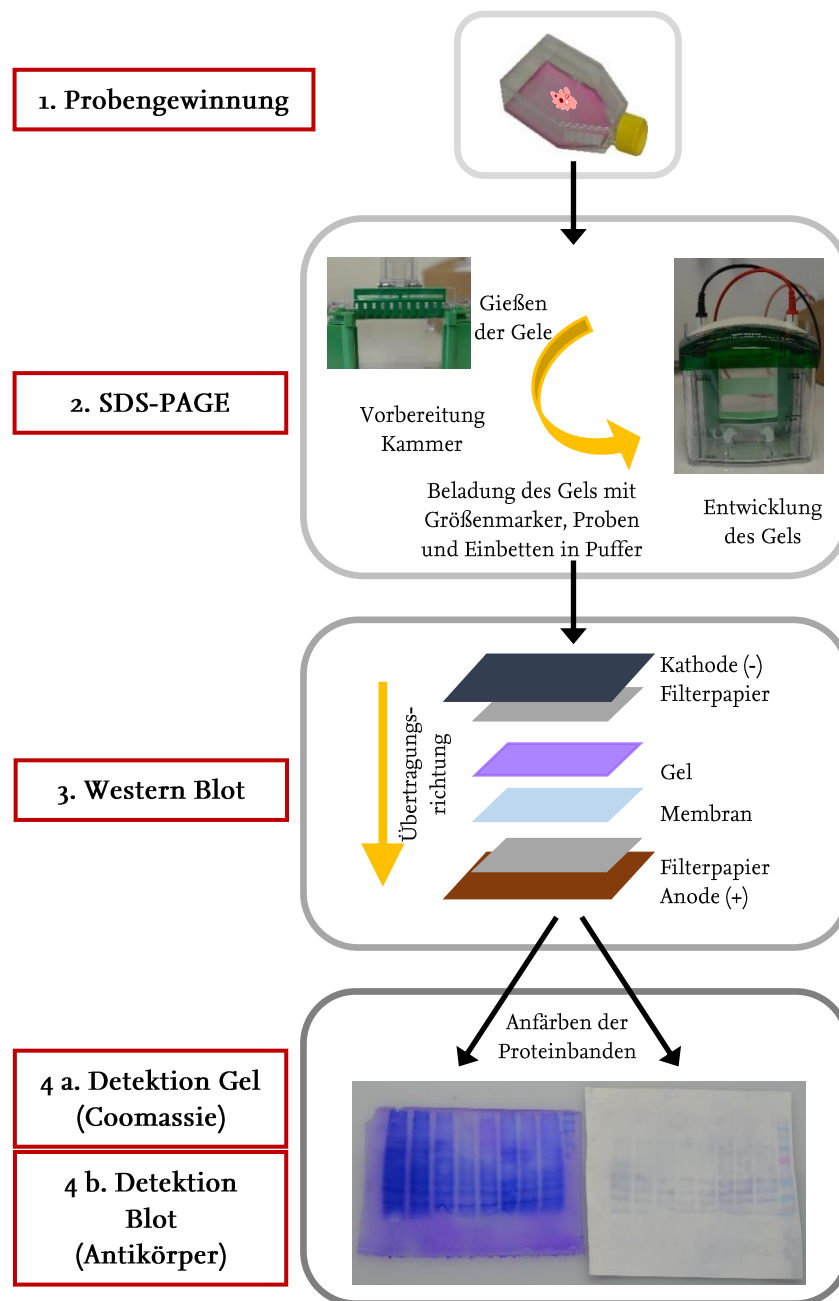


Abbildung 83 Western Blot Durchführung: oben: Probenvorbereitung und SDS-Page; Mitte: Aufbau der Blotkammer und Übertragungsrichtung; unten; Detektion mit Coomassie für das Gel und mit zwei Antikörpern und Substrat für die Membran

8.6.17 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zur elektrophoretischen Übertragung von Proteinen von einem Gel auf eine Membran. Auf dieser Membran kann immunologisch mit einem geeigneten Antikörper ein Zielprotein nachgewiesen werden. [248] Untersucht wird das humane Enzym TrxR₁, welches im Zytosol vorkommt. Als Primärantikörper wird dabei ein monoklonaler Maus-anti-human-TrxR₁ IgG₁ verwendet. Der Sekundärantikörper ist ein polyklonaler Ziege-anti-Maus IgG₁ mit HRP-Konjugat. Die Nachweisreaktion wird mit TMB durchgeführt, das durch die Meerrettichperoxidase umgesetzt werden kann.

Wenn nicht anders erwähnt, werden alle Wasch- und Inkubationsschritte auf einem Schüttler durchgeführt. Für den Blot-Vorgang wird eine PVDF-Membran in MeOH aktiviert, indem sie 5 min mit MeOH benetzt wird. Anschließend wird die Membran 1 min mit dH₂O gewaschen. Die Membran und das Filterpapier werden 5 min in 1x Transferpuffer äquilibriert, wobei das Filterpapier komplett getränkt sein muss. Das zu übertragene Gel wird in der letzten Minute hinzugefügt. Der Blot wird nach vorangehendem Schema (Abbildung 83) in einem SemiDry-Blotter aufgebaut und eingeschlossene Luftblasen vorsichtig ausgerollt. Für ein kleines Gel wird bei 15 V und 0,3 A 15 min lang entwickelt. Die erfolgreiche Übertragung kann anhand des gefärbten Proteinmarkers kontrolliert werden.

Das Gel kann wie zuvor beschrieben angefärbt werden. Die Membran wird ü.N. mit einer Milchpulver-Lsg. im Kühlschrank blockiert und anschließend dreimal mit TBS-T jeweils 5 min lang gewaschen.

Der Primärantikörper wird je nach Typ und Proteinmenge in TBS-T verdünnt (1:1000 bis 1:2000) und die Membran darin 1 h entwickelt. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T für jeweils 5 min wird die Membran für 30 min mit dem Sekundärantikörper (1:5000 bis 1:8000 in TBS-T) entwickelt. Es folgt erneutes Waschen mit TBS-T (dreimal je 5 min) und das Anfärben mit TMB unter Lichtausschluss. Die Farbreaktion wird mit dH₂O abgestoppt und die Membran getrocknet, sodass sie fotografiert und ausgewertet werden kann.

8.6.18 Untersuchungen am Zelllysate

Aus dem Zelllysate der Passage werden große Kulturflaschen mit HT-29-Zellen bestückt. Der Zellrasen muss mindestens bis zu einer Konfluenz von 90 % anwachsen. Die zu testenden Substanzen werden durch Mediumwechsel in einer Konzentration des doppelten IC₅₀-Wertes

auf den Zellrasen gegeben und die Zellen für 48 h mit den Substanzen inkubiert. Parallel zur Zellaufnahme wird aus dem Zellrasen eine Zellsuspension gewonnen, die im Folgenden immer auf Eis gelagert und verarbeitet wird.

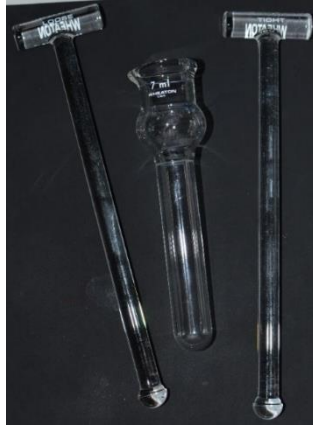


Abbildung 84 Zellmörser mit beiden Mörsern

Das Zellpellet wird in 500 μ l PBS resuspendiert und im Zellmörser (*Grinder*) 1 min mit dem *loose* und 4 min mit dem *tight* Mörser aufgeschlossen (Abbildung 84).

Die Zellsuspension wird in ein Reaktionsgefäß überführt, der Grinder mit 500 μ l PBS nachgespült und diese Flüssigkeit ebenfalls zur Zellsuspension gegeben. Die Zellsuspension wird 5 min bei 4500 U/min (2189 g) und 4 °C zentrifugiert, der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet verworfen. Der Proteingehalt des Überstandes wird mittels Bradford-Bestimmung (siehe 8.6.12) ermittelt, sodass die Proben für die folgenden Tests verwendet werden können.

8.6.19 Aktivität von disulfidspaltenden Enzymen

Die Aktivität der disulfidspaltenden Enzyme gibt einen Hinweis auf die inhibitorischen Fähigkeiten von Substanzen innerhalb der Zelle im Vergleich zu Untersuchungen an isolierten Enzymen. Der Test wird mit gewissen Anpassungen analog zur Inhibition der TrxR durchgeführt (8.6.15).

Die Proben werden für die Untersuchung mit dH₂O auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt. 25 μ l der Probenlösung werden mit 25 μ l Kaliumphosphatpuffer in einer 96-Well-Platte gemischt, ein Nullabgleich mit DMF wird ebenfalls angesetzt. Der weitere Verlauf des Versuchs erfolgt analog zum bereits beschriebenen TrxR-Inhibitionsassay, wobei das Zelllysat die TrxR-Lösung ersetzt. Für die Auswertung wird die Steigung der DMF-Probe als 100 % aktive

Enzyme angesehen und die Aktivität der mit Komplexen behandelten Zellen anteilig daran berechnet.

8.7 Formulierungsversuche

Im Rahmen des Verbundprojekts „SynFoBiA“ des Zentrums für Pharmaverfahrenstechnik werden zwei schwer lösliche Wirkstoffkandidaten zur Lösungsvermittlung in verschiedene Nanoemulsionen eingebracht. Die Nanoemulsionen wurden von Dr. Katrin Göke aus dem Arbeitskreis Bunjes der Pharmazeutischen Technologie hergestellt. Erste Versuche wurden von Andermark et al. durchgeführt. Um ein genaueres Bild des Wirk- und Trägerstoffverhaltens zu erhalten, werden die Untersuchungen ausgeweitet. Im Folgenden werden die Anpassungen der Versuche an die Nanoemulsionen sowie deren Handhabung beschrieben.

8.7.1 Zytotoxizität der Nanoemulsionen

Um den besten Kandidaten für die weiteren Versuche zu finden, werden verschiedene Lipidnanocarrier auf ihre antiproliferativen Effekte untersucht.

Bezeichnung, Art der Carrier, Zusammensetzung, Herstellungsmethode und Partikelgröße finden sich in Kapitel 6.1 in Tabelle 22.

Da für die Untersuchung keine Einzelkonzentration genutzt werden kann, werden die Lipidnanocarrier anhand ihrer Volumenkonzentration im Zellkulturmedium auf ihren Einfluss auf die Zellen untersucht. Hierfür wird eine Verdünnungsreihe der Lipidnanocarrier direkt mit dem jeweiligen Zellkulturmedium hergestellt (siehe Tabelle 44).

Konzentration [V/V]	10,00 %	5,00 %	2,50 %	1,00 %	0,5 %	0,25 %	0,10 %
McCoy [3 ml]	300 µl	150 µl	75 µl	30 µl	15 µl	7,5 µl	3 µl
DMEM [5 ml]	500 µl	250 µl	125 µl	50 µl	25 µl	12,5 µl	5 µl

Tabelle 44 Verdünnungsreihe anhand der Volumenkonzentration für die Lipidnanocarrier mit 10 % Fettanteil

Die Stabilität der Lipidnanocarrier während der Inkubationsphase über maximal 96 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wird anhand ihrer Partikelgröße mit der höchsten Carrierkonzentration (10 %) untersucht. Die Untersuchung führte Dr. K. Göke durch.

Da die Lipidnanocarrier verschiedene Effekte auf die Zellen zeigen, wird eine weitere Serie mit 20 % Fettanteil hergestellt, um bei gleichem Fettgehalt den Volumenanteil im Medium zu

reduzieren. Die Zubereitungen enthalten nun 2,25 % Glycerol zur Isotonisierung und die wässrige Phase besteht aus 67,75 % Wasser (siehe Tabelle 45). Die Lösungen für die Zellkultur lassen sich Tabelle 46 entnehmen.

Zubereitung	Art	Zusammensetzung	Herstellung	Partikelgröße
M812 HH	Emulsion	20 % Miglyol 812 10 % Poloxamer 188	Hochdruckhomogenisation	80 nm
Rapsöl HH	Emulsion	20 % Rapsöl 10 % Poloxamer 188	Hochdruckhomogenisation	86 nm

Tabelle 45 Zusammensetzung und Eigenschaften der Lipidnanocarrier für zellbiologische Untersuchungen

Konzentration [V/V]	10,00 %	5,00 %	2,50 %	1,00 %	0,5 %	0,25 %	0,10 %
McCoy [3 ml]	150 µl	75 µl	37,5 µl	15 µl	7,5 µl	3,75 µl	1,5 µl
DMEM [5 ml]	250 µl	125 µl	62,5 µl	25 µl	12,5 µl	6,25 µl	2,5 µl

Tabelle 46 Verdünnungsreihe anhand der Volumenkonzentration für die Lipidnanocarrier mit 20 % Fettanteil

8.7.2 Beladung und Goldgehaltbestimmung

Für die Beladungsversuche werden die mittels Hochdruckhomogenisation hergestellte Miglyol- und Rapsöl-Emulsion mit 20 % Fettanteil ausgesucht. Für alle biologischen Untersuchungen wird Rapsöl HH 20 % verwendet.

Die beiden Komplexe werden gemörsert und jeweils 2 mg Substanz in 2 ml Carrier gelöst. Der Lösungsvorgang wird bei RT unter Lichtschutz auf einem Schüttler bei 300 U/min für sieben Tage durchgeführt. Anschließend werden ungelöste Substanzrückstände mit einem 0,45 µm PVDF Filter unter aseptischen Bedingungen abgetrennt. Die beladene Nanoemulsion wird in ein Glasvial überführt und kann für analytische und biologische Untersuchungen verwendet werden.

Für Versuche in der Zellkultur wird der Gold- bzw. Komplexgehalt mittels HR-CR AAS ermittelt. Die beladene Nanoemulsion wird hierfür mit rH₂O 1 plus 99 verdünnt, laut Kapitel 8.6.14 behandelt und vermessen. Der ermittelte Komplexgehalt wird zur Berechnung der Verdünnungen für die Bestimmung der Zytotoxizität und Zellaufnahme verwendet.

Die Versuche müssen ab Beladung in schnellst möglichen Abständen durchgeführt werden, da die Emulsionen keine lange Haltbarkeit haben und jedes Vial für Gehaltbestimmung, Zytotoxizitätsassay und Zellaufnahme genutzt werden muss.

8.7.3 Zytotoxizität der beladene Nanoemulsion

Ausgehend vom ermittelten Goldgehalt wird über die molare Masse die Stoffmengenkonzentration der jeweiligen Substanz in der Nanoemulsion berechnet. Anhand dieser Konzentration wird eine passende Verdünnung direkt im jeweiligen Zellkulturmedium hergestellt. Die Testkonzentrationen sind dabei 10 μM , 8 μM , 5 μM , 4 μM , 2 μM , 1 μM und 0,5 μM bzw. 1 μM , 0,8 μM , 0,5 μM , 0,4 μM , 0,2 μM , 0,1 μM und 0,05 μM . Als Lösemittelkontrolle agiert die unbeladene Nanoemulsion mit dem höchsten verwendeten Volumen. Der Versuchsaufbau entspricht ansonsten dem aus Kapitel 8.6.8.

8.7.4 Zellaufnahme der beladenen Nanoemulsion

Die Inkubationskonzentration wird auf 10 μM erhöht und die Zeitpunkte 1 h, 4 h, 8 h und 24 h untersucht. Die Zellaufnahme wird ansonsten analog Vorschrift 8.6.11 durchgeführt und der Goldgehalt, wie in Kapitel 8.6.14 beschrieben, ermittelt.

9 Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Mentor Prof. Dr. Ingo Ott für die Möglichkeit danken, innerhalb seines Arbeitskreises ein interessantes Thema bearbeiten zu können. Durch die Freiheiten, die du uns lässt, können wir uns wissenschaftlich aber auch auf allen anderen Ebenen weiterentwickeln, was du durch dein konstruktives und positives Feedback unterstützt. Ich möchte dir auch ganz speziell für deine Geduld danken.

Im Weiteren möchte ich Prof. Dr. Conrad Kunick aus dem Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig für die Übernahme des Koreferats sowie Prof. Dr. Heike Bunjes aus dem Institut für Pharmazeutische Technologie für die Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission danken.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Alvaro Munoz Castro von der Universidad Autonoma de Chile für die Berechnungen, in die er seine Zeit investiert hat und dafür, immer einen Platz zum Schlafen in Chile zu haben.

Dr. Katrin Göke vom Institut für Pharmazeutische Technologie der TU Braunschweig möchte ich für den interessanten Austausch und für die tolle Zusammenarbeit mit den „Backsteinen“ danken.

Ein großes Danke geht an alle Mitarbeiter*innen des Instituts für Medizinische und Pharmazeutische Chemie der TU Braunschweig für die prägende Zeit und angenehme Zusammenarbeit in den letzten Jahren. Insbesondere gilt mein Dank Dr. Hans-Otto Burmeister, Dr. Johann Grünefeld, Dr. Lutz Preu, Britta Thomas, Thomas Hoffmann, Matthias Söchtig, Petra Reich, Sandra Meyer, Eduard Hinz und Frank Roesen dafür, dass sie uns oft unsichtbar die Arbeit erleichtern und den Tag verschönern.

Besonders danken möchte ich der Chili-Gruppe für ein heißes Projekt und Carolin Ratunde für die netten Gespräche, die tolle Kooperation und das Vertrauen, uns mit den Studenten in der Zellkultur arbeiten zu lassen. Franziska, an dieser Stelle möchte ich dir sehr für jede Tasse Tee, fachliche Dauergespräche und natürlich dafür danken, dass es bei euch immer was zu essen gibt. Den Assistenten*innen des zweiten Semesters sowie Kerstin Staats danke ich für die gegenseitige Unterstützung, wenn es um die Frage geht, ob die Lösung schon lachsfarben sei. Allen anderen, mit denen man zusammen einige Grillabende, Kittelverbrennungen,

Wanderungen, Weihnachtsfeiern und Werwolfrunden erlebt hat, danke ich für eine Zeit, an die ich mich sehr gerne erinnern werde.

Der herzlichste Dank gilt den amtierenden, ehemaligen und kurzzeitigen Ottern!

Wir sind das Wall-Of-Shame-Original mit teambildenden Puzzlen und einer teambildenden Spüle ;-P, den „Schabernack“-Fridays und gleich drei Maskottchen. Ich glaube nicht, jemals wieder so einen konstruktiven Chaostrupp zu finden, wie wir es waren. Danke für die tolle Zeit, in der ich so oft vor Lachen weinen musste, dass dadurch der Stress, den man so während einer Promotion hat, aufgewogen wird. Ich komme zu Besuch und bringe Kuchen mit.

Dr. Claudia und Dr. Hilke gilt mein ganz besonderer Dank, ohne euch wäre ich nicht nur beim AAS-Vergolden durchgedreht, ich hätte auch niemals so viel super kreativen Spaß gehabt. Ich bin mir sicher, dass wir in dieser Zeit Freunde fürs Leben gefunden haben.

Claudia, wir wuscheln uns seit 2006 gemeinsam durch und die „oh ich wollte schon vor 3 Stunden los“-Gespräche (ortsunabhängig) und der konstruktiven fachlichen Austausch in weinlastigen Postersessions waren mir immer eine Freude und Ehre.

Hilke, manchmal findet man unerwartet Leute, die man in sein Herz schließt und die lebenslang wlan-Zugriff bekommen, mit denen man fachliche Probleme diskutieren kann und die dann auch noch mit einem die Lieblingslieder voller Inbrunst performen.

Allen fleißigen Korrekturleser*innen gilt mein innigster Dank für die kritische und konstruktive Überarbeitung dieses Schriftstücks. Hans, ohne deinen Blick für den roten Faden und die Kürzung meiner geliebten Schachtelsätze wüsste wahrscheinlich keiner, was ich sagen will. Claudia und Lynn, ohne euch wäre ich an der Korrektur von 202 Seiten und der Komprimierung auf 30 min sehr sicher verzweifelt.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie und Andreas danken, dafür dass ihr immer für mich da seid, an mich glaubt und mich unterstützt. Andi, wir können auf das (Dr. A. Varchmin)² anstoßen und um mein jüngeres ich zu zitieren „Danke, dass du in mein Leben getreten bist und bleibst“. [249]

10 Literaturverzeichnis

1. Gil-Moles M., Basu U., Büssing R., Hoffmeister H., Türck S., Varchmin A., Ott I. (2020) Gold Metallodrugs to Target Coronavirus Proteins: Inhibitory Effects on the Spike-ACE2 Interaction and on PLpro Protease Activity by Auranofin and Gold Organometallics. Chemistry. doi:10.1002/chem.202004112
2. Mukherjee S., Schaden B., Pleitgen F. (2012) Der König aller Krankheiten. Krebs - eine Biografie, 2. Aufl. DuMont
3. Robert-Koch-Institut Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016
4. Robert-Koch-Institut Krebs in Deutschland 2015/2016
5. Statistisches Bundesamt Todesursachen in Deutschland 2015 (Fachserie 12 Reihe 4)
6. Statistisches Bundesamt (2021+0100) Krebs war 2019 für ein Viertel aller Todesfälle in Deutschland verantwortlich.
https://www.destatis.de/DE/Presse/Pressemitteilungen/2021/02/PD21_No10_231.html;jsessionid=449C655C140FD611B79BCFF32BCDCoDB.live721. Zugegriffen: 19. Juni 2021.831Z
7. Steinhilber D., Schubert-Zsilavecz M., Roth H. (2010) Medizinische Chemie. Targets - Arzneistoffe - chemische Biologie, 2. Aufl. Deutscher Apotheker-Verlag
8. Romero-Garcia S., Lopez-Gonzalez J., B'ez-Viveros J., Aguilar-Cazares D., Prado-Garcia H. (2011) Tumor cell metabolism: An integral view. Cancer Biol Ther 12(11):939–948. doi:10.4161/cbt.12.11.18140
9. Warburg O. (1956) On the origin of cancer cells. Science 123(3191):309–314. doi:10.1126/science.123.3191.309
10. Wang Y., Xia Y., Lu Z. (2018) Metabolic features of cancer cells. Cancer Commun (Lond) 38. doi:10.1186/s40880-018-0335-7
11. Almog N. (2010) Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. Cancer Lett 294(2):139–146. doi:10.1016/j.canlet.2010.03.004
12. Folkman J. (2003) Angiogenesis and apoptosis. Semin Cancer Biol 13(2):159–167. doi:10.1016/S1044-579X(02)00133-5
13. Chaffer C., Weinberg R. (2011) A perspective on cancer cell metastasis. Science 331(6024):1559–1564. doi:10.1126/science.1203543
14. Beatty G., Gladney W. (2015) Immune escape mechanisms as a guide for cancer immunotherapy. Clin Cancer Res 21(4):687–692. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1860
15. Forth W., Henschler D., Rummel W., Förstermann U., Starke K. (2002) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker, 8. Aufl. Urban & Fischer
16. Lüllmann H., Mohr K., Hein L. (2008) Taschenatlas Pharmakologie, 6. Aufl. Thieme
17. Vasan N., Baselga J., Hyman D. (2019) A view on drug resistance in cancer. Nature 575(7782):299–309. doi:10.1038/s41586-019-1730-1
18. Richter K., Kschonsak Y., Vodicka B., Hoffmann I. (2020) FBXO45-MYCBP2 regulates mitotic cell fate by targeting FBXW7 for degradation. Cell Death Differ 27(2):758–772. doi:10.1038/s41418-019-0385-7
19. Nowell P. (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. Science 194(4260):23–28. doi:10.1126/science.959840

20. Oehninger L. (2014) Ruthenium and rhodium N-heterocyclic carbene complexes as anticancer agents: chemical properties and their influence on the biological activity. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
21. Löffler G., Schölmerich J. (2008) Basiswissen Biochemie. Mit Pathobiochemie ; mit 139 Tabellen ; [jetzt mit Fällen], 7. Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer
22. Lang F., Lang P. (2007) Basiswissen Physiologie, 2. Aufl. Springer-Lehrbuch. Springer Medizin Verlag Heidelberg
23. Vollhardt K., Schore N., Butenschön H., Roy K.-M. (2011) Organische Chemie, 5. Aufl. Wiley-VCH
24. Hart H., Craine L., Hart D., Hadad C. (2007) Organische Chemie. Bachelor. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
25. Carey F., Sundberg R., Schäfer H. (2004) Organische Chemie. Ein weiterführendes Lehrbuch, 2. Aufl. Wiley-VCH
26. Kraatz H.-B., Metzler-Nolte N. (2006) Concepts and models in bioinorganic chemistry. Wiley-VCH
27. Alessio E. (2011) Bioinorganic Medicinal Chemistry, 1. Aufl. Wiley-VCH
28. Lo K. (2016) Inorganic and Organometallic Transition Metal Complexes with Biological Molecules and Living Cells. Elsevier Science
29. Guo Z., Sadler P. (1999) Metalle in der Medizin. Angew. Chem. Int. Ed. 111(11):1610–1630. doi:10.1002/(SICI)1521-3757(19990601)111:11<1610::AID-ANGE1610>3.0.CO;2-Q
30. Ott I., Gust R. (2007) Non platinum metal complexes as anti-cancer drugs. Arch Pharm (Weinheim) 340(3):117–126. doi:10.1002/ardp.200600151
31. Gasser G., Ott I., Metzler-Nolte N. (2011) Organometallic anticancer compounds. J Med Chem 54(1):3–25. doi:10.1021/jm100020w
32. Ott I., Gust R. (2006) Alkylanzien/Metallkomplexe. Pharm. Unserer Zeit 35(2):93. doi:10.1002/pauz.200690045
33. Trondl R., Heffeter P., Kowol C., Jakupec M., Berger W., Keppler B. (2014) NKP-1339, the first ruthenium-based anticancer drug on the edge to clinical application. Chem Sci 5(8):2925–2932. doi:10.1039/C3SC53243G
34. Rubbiani R., Wahrig B., Ott I. (2014) Historical and biochemical aspects of a seventeenth century gold-based aurum vitae recipe. J Biol Inorg Chem 19(6):961–965. doi:10.1007/s00775-014-1135-4
35. Owings J., McNair N., Mui Y., Gustafsson T., Holmgren A., Contel M., Goldberg J., Mead J. (2016) Auranofin and N-heterocyclic carbene gold-analogs are potent inhibitors of the bacteria Helicobacter pylori. FEMS Microbiol Lett 363(14). doi:10.1093/femsle/fnw148
36. Ray S., Mohan R., Singh J., Samantaray M., Shaikh M., Panda D., Ghosh P. (2007) Anticancer and antimicrobial metallopharmaceutical agents based on palladium, gold, and silver N-heterocyclic carbene complexes. J Am Chem Soc 129(48):15042–15053. doi:10.1021/ja075889z
37. Ott I. (2009) On the medicinal chemistry of gold complexes as anticancer drugs. Coordination Chemistry Reviews 253(11-12):1670–1681. doi:10.1016/j.ccr.2009.02.019
38. Dinda J., Samanta T., Nandy A., Saha K., Seth S., Chattopadhyay S., Bielawski C. (2014) N-heterocyclic carbene supported Au(i) and Au(iii) complexes: a comparison of cytotoxicities. New J. Chem. 38(3):1218–1224. doi:10.1039/C3NJ01463K
39. Nandy A., Samanta T., Mallick S., Mitra P., Seth S., Saha K., Al-Deyab S., Dinda J. (2016) Synthesis of gold(iii) ← gold(i)-NHC through disproportionation: the role of gold(i)-NHC

- in the induction of apoptosis in HepG2 cells. *New J. Chem.* 40(7):6289–6298. doi:10.1039/C5NJ02979A
40. Rana B., Nandy A., Bertolasi V., Bielawski C., Das Saha K., Dinda J. (2014) Novel Gold(I)- and Gold(III)-N-Heterocyclic Carbene Complexes: Synthesis and Evaluation of Their Anticancer Properties. *Organometallics* 33(10):2544–2548. doi:10.1021/om500118x
 41. Ronconi L., Fregona D. (2009) The Midas touch in cancer chemotherapy: from platinum- to gold-dithiocarbamate complexes. *Dalton Trans* (48):10670–10680. doi:10.1039/b913597a
 42. Ronconi L., Marzano C., Zanello P., Corsini M., Miolo G., Maccà C., Trevisan A., Fregona D. (2006) Gold(III) dithiocarbamate derivatives for the treatment of cancer: solution chemistry, DNA binding, and hemolytic properties. *J Med Chem* 49(5). doi:10.1021/jm0509288
 43. Ronconi L., Giovagnini L., Marzano C., Bettio F., Graziani R., Pilloni G., Fregona D. (2005) Gold dithiocarbamate derivatives as potential antineoplastic agents: design, spectroscopic properties, and in vitro antitumor activity. *Inorg. Chem.* 44(6):1867–1881. doi:10.1021/ic048260v
 44. Fung S., Zou T., Cao B., Lee P.-Y., Fung Y., Di Hu, Lok C.-N., Che C.-M. (2017) Cyclometalated Gold(III) Complexes Containing N-Heterocyclic Carbene Ligands Engage Multiple Anti-Cancer Molecular Targets. *Angew. Chem. Int. Ed.* 129(14):3950–3954. doi:10.1002/ange.201612583
 45. Chan K., Tong G., To W.-P., Yang C., Du L., Phillips D., Che C.-M. (2017) The interplay between fluorescence and phosphorescence with luminescent gold(i) and gold(iii) complexes bearing heterocyclic arylacetylide ligands. *Chem Sci* 8(3):2352–2364. doi:10.1039/c6sc03775e
 46. Tong K.-C., Lok C.-N., Wan P.-K., Di Hu, Fung Y., Chang X.-Y., Huang S., Jiang H., Che C.-M. (2020) An anticancer gold(III)-activated porphyrin scaffold that covalently modifies protein cysteine thiols. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117(3):1321–1329. doi:10.1073/pnas.1915202117
 47. Shaw C. (1999) Gold-Based Therapeutic Agents. *Chem Rev* 99(9):2589–2600. doi:10.1021/cr980431o
 48. Yeo C., Ooi K., Tiekink E. (2018) Gold-Based Medicine: A Paradigm Shift in Anti-Cancer Therapy? *Molecules* 23(6). doi:10.3390/molecules23061410
 49. Milacic V., Dou Q. (2009) The tumor proteasome as a novel target for gold(III) complexes: implications for breast cancer therapy. *Coordination Chemistry Reviews* 253(11-12):1649–1660. doi:10.1016/j.ccr.2009.01.032
 50. Gade L., Lewis J. (2010) *Koordinationschemie*, 1. Aufl. Wiley-VCH
 51. Andermark V., Göke K., Kokoschka M., Abu El Maaty M., Lum C., Zou T., Sun R., Aguiló E., Oehninger L., Rodríguez L., Bunjes H., Wölfl S., Che C.-M., Ott I. (2016) Alkynyl gold(I) phosphane complexes: Evaluation of structure-activity-relationships for the phosphane ligands, effects on key signaling proteins and preliminary in-vivo studies with a nanoformulated complex. *J Inorg Biochem* 160:140–148. doi:10.1016/j.jinorgbio.2015.12.020
 52. Arcau J., Andermark V., Aguiló E., Gandioso A., Moro A., Cetina M., Lima J., Rissanen K., Ott I., Rodríguez L. (2014) Luminescent alkynyl-gold(I) coumarin derivatives and their biological activity. *Dalton Trans* 43(11):4426–4436. doi:10.1039/c3dt52594e
 53. Bagowski C., You Y., Scheffler H., Vlecken D., Schmitz D., Ott I. (2009) Naphthalimide gold(I) phosphine complexes as anticancer metallodrugs. *Dalton Trans* (48):10799–10805. doi:10.1039/b912378d

54. Chui C.-H., Wong R., Gambari R., Cheng G., Yuen M., Chan K.-W., Tong S.-W., Lau F.-Y., Lai P., Lam K.-H., Ho C.-L., Kan C.-W., Leung K., Wong W.-Y. (2009) Antitumor activity of diethynylfluorene derivatives of gold(I). *Bioorg Med Chem* 17(23):7872–7877. doi:10.1016/j.bmc.2009.10.034
55. Deponte M., Urig S., Arscott L., Fritz-Wolf K., Réau R., Herold-Mende C., Koncarevic S., Meyer M., Davioud-Charvet E., Ballou D., Williams C., Becker K. (2005) Mechanistic studies on a novel, highly potent gold-phosphole inhibitor of human glutathione reductase. *J Biol Chem* 280(21):20628–20637. doi:10.1074/jbc.M412519200
56. Gavara R., Aguiló E., Schur J., Llorca J., Ott I., Rodríguez L. (2016) Study of the effect of the chromophore and nuclearity on the aggregation and potential biological activity of gold(I) alkynyl complexes. *Inorganica Chimica Acta* 446:189–197. doi:10.1016/j.ica.2016.03.012
57. Hikisz P., Szczupak Ł., Koceva-Chyła A., Gu Spiel A., Oehninger L., Ott I., Therrien B., Solecka J., Kowalski K. (2015) Anticancer and Antibacterial Activity Studies of Gold(I)-Alkynyl Chromones. *Molecules* 20(11):19699–19718. doi:10.3390/molecules201119647
58. Jortzik E., Farhadi M., Ahmadi R., Tóth K., Lohr J., Helmke B., Kehr S., Unterberg A., Ott I., Gust R., Deborde V., Davioud-Charvet E., Réau R., Becker K., Herold-Mende C. (2014) Antiglioma activity of GoPI-sugar, a novel gold(I)-phosphole inhibitor: chemical synthesis, mechanistic studies, and effectiveness in vivo. *Biochim Biophys Acta* 1844(8):1415–1426. doi:10.1016/j.bbapap.2014.01.006
59. Langdon-Jones E., Lloyd D., Hayes A., Wainwright S., Mottram H., Coles S., Horton P., Pope S. (2015) Alkynyl-naphthalimide Fluorophores: Gold Coordination Chemistry and Cellular Imaging Applications. *Inorg Chem* 54(13):6606–6615. doi:10.1021/acs.inorgchem.5b00954
60. Meyer A., Bagowski C., Kokoschka M., Stefanopoulou M., Alborzinia H., Can S., Vlecken D., Sheldrick W., Wölfl S., Ott I. (2012) On the biological properties of alkynyl phosphine gold(I) complexes. *Angew Chem Int Ed Engl* 51(35):8895–8899. doi:10.1002/anie.201202939
61. Mirzadeh N., Privér S., Abraham A., Shukla R., Bansal V., Bhargava S. (2015) Linking Flavonoids to Gold - A New Family of Gold Compounds for Potential Therapeutic Applications. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2015(25):4275–4279. doi:10.1002/ejic.201500514
62. Nisi A. de, Bergamini C., Leonzio M., Sartor G., Fato R., Naldi M., Monari M., Calonghi N., Bandini M. (2016) Synthesis, cytotoxicity and anti-cancer activity of new alkynyl-gold(I) complexes. *Dalton Trans* 45(4):1546–1553. doi:10.1039/c5dt02905h
63. Stefan L., Bertrand B., Richard P., Le Gendre P., Denat F., Picquet M., Monchaud D. (2012) Assessing the differential affinity of small molecules for noncanonical DNA structures. *Chembiochem* 13(13):1905–1912. doi:10.1002/cbic.201200396
64. Walther W., Dada O., O’Beirne C., Ott I., Sánchez-Sanz G., Schmidt C., Werner C., Zhu X., Tacke M. (2016) In Vitro and In Vivo Investigations into the Carbene Gold Chloride and Thioglucoside Anticancer Drug Candidates NHC-AuCl and NHC-AuSR. *LDDD* 14(2):125–134. doi:10.2174/1570180813666160826100158
65. Wetzel C., Kunz P., Kassack M., Hamacher A., Böhler P., Watjen W., Ott I., Rubbiani R., Spingler B. (2011) Gold(I) complexes of water-soluble diphos-type ligands: synthesis, anticancer activity, apoptosis and thioredoxin reductase inhibition. *Dalton Trans* 40(36):9212–9220. doi:10.1039/c1dt10368g
66. Muenzner J., Biersack B., Albrecht A., Rehm T., Lacher U., Milius W., Casini A., Zhang J.-J., Ott I., Brabec V., Stuchlikova O., Andronache I., Kaps L., Schuppan D., Schobert R. (2016) Ferrocenyl-Coupled N-Heterocyclic Carbene Complexes of Gold(I): A Successful Approach

- to Multinuclear Anticancer Drugs. *Chemistry* 22(52):18953–18962. doi:10.1002/chem.201604246
67. Vicente J., Singhal A., Jones P. (2002) New Ylide-, Alkynyl-, and Mixed Alkynyl/Ylide–Gold(I) Complexes. *Organometallics* 21(26):5887–5900. doi:10.1021/omo20753p
 68. Schmidt C., Karge B., Misgeld R., Prokop A., Brönstrup M., Ott I. (2017) Biscarbene gold(i) complexes: structure-activity-relationships regarding antibacterial effects, cytotoxicity, TrxR inhibition and cellular bioavailability. *Med. Chem. Commun.* 8(8):1681–1689. doi:10.1039/c7md00269f
 69. Zhang J.-J., Muenzner J., Abu El Maaty M., Karge B., Schobert R., Wölfl S., Ott I. (2016) A multi-target caffeine derived rhodium(i) N-heterocyclic carbene complex: evaluation of the mechanism of action. *Dalton Trans* 45(33):13161–13168. doi:10.1039/c6dt02025a
 70. Meyer A., Oehninger L., Geldmacher Y., Alborzinia H., Wölfl S., Sheldrick W., Ott I. (2014) Gold(I) N-heterocyclic carbene complexes with naphthalimide ligands as combined thioredoxin reductase inhibitors and DNA intercalators. *ChemMedChem* 9(8):1794–1800. doi:10.1002/cmdc.201402049
 71. Wiglenda T., Ott I., Kircher B., Schumacher P., Schuster D., Langer T., Gust R. (2005) Synthesis and pharmacological evaluation of 1H-imidazoles as ligands for the estrogen receptor and cytotoxic inhibitors of the cyclooxygenase. *J Med Chem* 48(20):6516–6521. doi:10.1021/jm050190u
 72. Bertrand B., Stefan L., Pirrotta M., Monchaud D., Bodio E., Richard P., Le Gendre P., Warmerdam E., Jager M. de, Groothuis G., Picquet M., Casini A. (2014) Caffeine-based gold(I) N-heterocyclic carbenes as possible anticancer agents: synthesis and biological properties. *Inorg Chem* 53(4):2296–2303. doi:10.1021/ic403011h
 73. Meier-Menches S., Aikman B., Döllner D., Klooster W., Coles S., Santi N., Luk L., Casini A., Bonsignore R. (2020) Comparative biological evaluation and G-quadruplex interaction studies of two new families of organometallic gold(I) complexes featuring N-heterocyclic carbene and alkynyl ligands. *J Inorg Biochem* 202:110844. doi:10.1016/j.jinorgbio.2019.110844
 74. Köster S., Alborzinia H., Can S., Kitanovic I., Wölfl S., Rubbiani R., Ott I., Riesterer P., Prokop A., Merz K., Metzler-Nolte N. (2012) A spontaneous gold(i)-azide alkyne cycloaddition reaction yields gold-peptide bioconjugates which overcome cisplatin resistance in a p53-mutant cancer cell line. *Chem Sci* 3(6):2062. doi:10.1039/c2sc01127a
 75. Serebryanskaya T., Zolotarev A., Ott I. (2015) A novel aminotriazole-based NHC complex for the design of gold(i) anti-cancer agents: synthesis and biological evaluation. *Med. Chem. Commun.* 6(6):1186–1189. doi:10.1039/C5MD00185D
 76. Vicente J., Chicote M.-T., Abrisqueta M., Alvarez-Falcón M. (2002) The first anionic arenediethynylgold(I) complexes. *Journal of Organometallic Chemistry* 663(1–2):40–45. doi:10.1016/S0022-328X(02)01621-2
 77. Vicente J., Chicote M.-T., Alvarez-Falcón M., Bautista D. (2004) The First Metal Complexes Derived from 3,5-Diethynylpyridine. X-ray Crystal Structure of $[(\text{AuPTo}_3)_2 \{ \mu\text{-(C:C)}_2 \text{Py} \}]$ (Py = Pyridine-3,5-diyl; To = p-Tolyl). *Organometallics* 23(24):5707–5712. doi:10.1021/omo49509j
 78. Garrison J., Youngs W. (2005) Ag(I) N-heterocyclic carbene complexes: synthesis, structure, and application. *Chem Rev* 105(11):3978–4008. doi:10.1021/cr050004s
 79. Yang C., Dantzig A., Pidgeon C. (1999) Intestinal peptide transport systems and oral drug availability. *Pharm Res* 16(9):1331–1343. doi:10.1023/a:1018982505021

80. Bertrand B., Casini A. (2014) A golden future in medicinal inorganic chemistry: the promise of anticancer gold organometallic compounds. *Dalton Trans* 43(11):4209–4219. doi:10.1039/c3dt52524d
81. García-Moreno E., Tomás A., Atrián-Blasco E., Gascón S., Romanos E., Rodríguez-Yoldi M., Cerrada E., Laguna M. (2016) In vitro and in vivo evaluation of organometallic gold(I) derivatives as anticancer agents. *Dalton Trans* 45(6):2462–2475. doi:10.1039/c5dt01802a
82. Messori L., Scaletti F., Massai L., Cinellu M., Gabbiani C., Vergara A., Merlino A. (2013) The mode of action of anticancer gold-based drugs: a structural perspective. *Chem Commun (Camb)* 49(86):10100–10102. doi:10.1039/c3cc46400h
83. Holenya P., Can S., Rubbiani R., Alborzinia H., Jünger A., Cheng X., Ott I., Wölfl S. (2014) Detailed analysis of pro-apoptotic signaling and metabolic adaptation triggered by a N-heterocyclic carbene-gold(I) complex. *Metallomics* 6(9):1591–1601. doi:10.1039/c4mt00075g
84. Cheng X., Holenya P., Can S., Alborzinia H., Rubbiani R., Ott I., Wölfl S. (2014) A TrxR inhibiting gold(I) NHC complex induces apoptosis through ASK1-p38-MAPK signaling in pancreatic cancer cells. *Mol Cancer* 13:221. doi:10.1186/1476-4598-13-221
85. Yan C., Siegel D., Newsome J., Chilloux A., Moody C., Ross D. (2012) Antitumor indolequinones induced apoptosis in human pancreatic cancer cells via inhibition of thioredoxin reductase and activation of redox signaling. *Mol Pharmacol* 81(3):401–410. doi:10.1124/mol.111.076091
86. Sánchez-de-Diego C., Mármol I., Pérez R., Gascón S., Rodríguez-Yoldi M., Cerrada E. (2017) The anticancer effect related to disturbances in redox balance on Caco-2 cells caused by an alkynyl gold(I) complex. *J Inorg Biochem* 166:108–121. doi:10.1016/j.jinorgbio.2016.11.009
87. Nordberg J., Arnér E. (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system¹ This review is based on the licentiate thesis “Thioredoxin reductase—interactions with the redox active compounds 1-chloro-2,4-dinitrobenzene and lipoic acid” by Jonas Nordberg, 2001, Karolinska Institute, Stockholm, ISBN 91-631-1064-4. *Free Radical Biology and Medicine* 31(11):1287–1312. doi:10.1016/S0891-5849(01)00724-9
88. Saccoccia F., Angelucci F., Boumis G., Brunori M., Miele A., Williams D., Bellelli A. (2012) On the mechanism and rate of gold incorporation into thiol-dependent flavoreductases. *J Inorg Biochem* 108:105–111. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.11.005
89. Gabbiani C., Mastrobuoni G., Sorrentino F., Dani B., Rigobello M., Bindoli A., Cinellu M., Pieraccini G., Messori L., Casini A. (2011) Thioredoxin reductase, an emerging target for anticancer metallodrugs. Enzyme inhibition by cytotoxic gold(III) compounds studied with combined mass spectrometry and biochemical assays. *Med. Chem. Commun.* 2(1):50–54. doi:10.1039/C0MD00181C
90. Scheffler H., You Y., Ott I. (2010) Comparative studies on the cytotoxicity, cellular and nuclear uptake of a series of chloro gold(I) phosphine complexes. *Polyhedron* 29(1):66–69. doi:10.1016/j.poly.2009.06.007
91. Vergara E., Cerrada E., Casini A., Zava O., Laguna M., Dyson P. (2010) Antiproliferative Activity of Gold(I) Alkyne Complexes Containing Water-Soluble Phosphane Ligands. *Organometallics* 29(11):2596–2603. doi:10.1021/om100300a
92. Rubbiani R., Salassa L., Almeida A. de, Casini A., Ott I. (2014) Cytotoxic gold(I) N-heterocyclic carbene complexes with phosphane ligands as potent enzyme inhibitors. *ChemMedChem* 9(6):1205–1210. doi:10.1002/cmdc.201400056

93. Meyer A., Gutiérrez A., Ott I., Rodríguez L. (2013) Phosphine-bridged dinuclear gold(I) alkynyl complexes. Thioredoxin reductase inhibition and cytotoxicity. *Inorganica Chimica Acta* 398:72–76. doi:10.1016/j.ica.2012.12.013
94. Thomas Dröge, Frank Glorius (2010) Das Maß aller Ringe – N-heterocyclische Carbene. *Angewandte Chemie* 122(39):7094–7107. doi:10.1002/ange.201001865
95. Liu W., Gust R. (2013) Metal N-heterocyclic carbene complexes as potential antitumor metallodrugs. *Chem Soc Rev* 42(2):755–773. doi:10.1039/c2cs35314h
96. Oehninger L., Rubbiani R., Ott I. (2013) N-Heterocyclic carbene metal complexes in medicinal chemistry. *Dalton Trans* 42(10):3269–3284. doi:10.1039/c2dt32617e
97. Arduengo A., Dias H., Harlow R., Kline M. (1992) Electronic stabilization of nucleophilic carbenes. *J. Am. Chem. Soc.* 114(14):5530–5534. doi:10.1021/ja00040a007
98. Hahn F., Jahnke M. (2008) Heterocyclic carbenes: synthesis and coordination chemistry. *Angew Chem Int Ed Engl* 47(17):3122–3172. doi:10.1002/anie.200703883
99. Herrmann W., Köcher C. (1997) N-Heterocyclic Carbenes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36(20):2162–2187. doi:10.1002/anie.199721621
100. Frémont P. de, Marion N., Nolan S. (2009) Carbenes: Synthesis, properties, and organometallic chemistry. doi:10.1016/J.CCR.2008.05.018
101. Frémont P. de, Stevens E., Fructos M., Mar Díaz-Requejo M., Pérez P., Nolan S. (2006) Synthesis, isolation and characterization of cationic gold(I) N-heterocyclic carbene (NHC) complexes. *Chem Commun (Camb)* (19):2045–2047. doi:10.1039/b601547f
102. Lünig A., Schur J., Hamel L., Ott I., Klein A. (2013) Strong Cytotoxicity of Organometallic Platinum Complexes with Alkynyl Ligands. *Organometallics* 32(13):3662–3672. doi:10.1021/om400293u
103. Vanicek S., Kopacka H., Wurst K., Vergeiner S., Kankowski S., Schur J., Bildstein B., Ott I. (2016) Cobaltoceniumethynyl gold(I) as an unusual heterodinuclear bioorganometallic fragment to study the biological properties of alkynyl gold complexes. *Dalton Trans* 45(4):1345–1348. doi:10.1039/c5dto4796j
104. Meneni S., Ott I., Sergeant C., Sniady A., Gust R., Dembinski R. (2007) 5-Alkynyl-2'-deoxyuridines: chromatography-free synthesis and cytotoxicity evaluation against human breast cancer cells. *Bioorg Med Chem* 15(8):3082–3088. doi:10.1016/j.bmc.2007.01.048
105. Ott I., Bagowski C., Meyer A. (2013) Goldverbindungen mit Alkynyl-Liganden und deren therapeutische Verwendung
106. Gao L., Partyka D., Updegraff J., Deligonul N., Gray T. (2009) Synthesis, Structures, and Excited-State Geometries of Alkynylgold(I) Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2009(18):2711–2719. doi:10.1002/ejic.200900307
107. Garg J., Blaque O., Heier J., Venkatesan K. (2012) (Benzimidazolin-2-ylidene)-AuI-Alkynyl Complexes. Syntheses, Structure, and Photophysical Properties. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2012(11):1750–1763. doi:10.1002/ejic.201101351
108. Manbeck G., Kohler M., Porter M., Stockland R. (2011) P-H activation using alkynylgold substrates: steric and electronic effects. *Dalton Trans* 40(46):12595–12606. doi:10.1039/c1dt11337b
109. Vellé A., Maguire R., Kavanagh K., Sanz Miguel P., Montagner D. (2017) Steroid-AuI -NHC Complexes: Synthesis and Antibacterial Activity. *ChemMedChem* 12(11):841–844. doi:10.1002/cmdc.201700257

110. Oberkofler J., Aikman B., Bonsignore R., Pöthig A., Platts J., Casini A., Kühn F. (2020) Exploring the Reactivity and Biological Effects of Heteroleptic N-Heterocyclic Carbene Gold(I)-Alkynyl Complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.* 7:573. doi:10.1002/ejic.201901043
111. Rubbiani R., Schuh E., Meyer A., Lemke J., Wimberg J., Metzler-Nolte N., Meyer F., Ott I. (2013) TrxR inhibition and antiproliferative activities of structurally diverse gold N-heterocyclic carbene complexes. *Med. Chem. Commun.* 4(6):942. doi:10.1039/c3md00076a
112. Rubbiani R., Can S., Kitanovic I., Alborzinia H., Stefanopoulou M., Kokoschka M., Mönchgesang S., Sheldrick W., Wölfl S., Ott I. (2011) Comparative in vitro evaluation of N-heterocyclic carbene gold(I) complexes of the benzimidazolylidene type. *J Med Chem* 54(24):8646–8657. doi:10.1021/jm201220n
113. Rubbiani R., Kitanovic I., Alborzinia H., Can S., Kitanovic A., Onambele L., Stefanopoulou M., Geldmacher Y., Sheldrick W., Wolber G., Prokop A., Wölfl S., Ott I. (2010) Benzimidazol-2-ylidene gold(I) complexes are thioredoxin reductase inhibitors with multiple antitumor properties. *J Med Chem* 53(24):8608–8618. doi:10.1021/jm100801e
114. Schmidt C., Karge B., Misgeld R., Prokop A., Franke R., Brönstrup M., Ott I. (2017) Gold(I) NHC Complexes. Antiproliferative Activity, Cellular Uptake, Inhibition of Mammalian and Bacterial Thioredoxin Reductases, and Gram-Positive Directed Antibacterial Effects. *Chemistry* 23(8):1869–1880. doi:10.1002/chem.201604512
115. Arcau J., Andermark V., Rodrigues M., Giannicchi I., Pérez-Garcia L., Ott I., Rodríguez L. (2014) Synthesis and Biological Activity of Gold(I) N-Heterocyclic Carbene Complexes with Long Aliphatic Side Chains. *Eur. J. Inorg. Chem.* 2014(35):6117–6125. doi:10.1002/ejic.201402819
116. Rubbiani R. Gold (I) N-Heterocyclic Carbene Complexes: a Chemical and Biological Study of their Therapeutic Potential as New Anticancer Agents. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
117. Krüger M., Huang M., Becker-Roß H., Florek S., Ott I., Gust R. (2012) Quantification of the fluorine containing drug 5-fluorouracil in cancer cells by GaF molecular absorption via high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 69:50–55. doi:10.1016/j.sab.2012.02.004
118. Würtenberger I., Gust R. (2014) A highly sensitive method for in vitro testing of fluorinated drug candidates using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry (HR-CS MAS). *Anal Bioanal Chem* 406(14):3431–3442. doi:10.1007/s00216-014-7780-1
119. Würtenberger I., Follia V., Lerch F., Cwikla C., Fahrner N., Kalchschmidt C., Flögel B., Kircher B., Gust R. (2015) Fluorinated Fe(III) salophene complexes: optimization of tumor cell specific activity and utilization of fluorine labeling for in vitro analysis. *J Med Chem* 58(2):588–597. doi:10.1021/jm500986h
120. Fotherby K. (1996) Bioavailability of orally administered sex steroids used in oral contraception and hormone replacement therapy. *Contraception* 54(2):59–69. doi:10.1016/0010-7824(96)00136-9
121. Stockland R., Kohler M., Guzei I., Kastner M., Bawiec J., Labaree D., Hochberg R. (2006) Organometallic Complexes Containing 17-Ethynyl-17 β -hydroxyandrost-4-en-3-one and Related Ethynyl Steroids. *Organometallics* 25(10):2475–2485. doi:10.1021/om051064r
122. Antalis C., Uchida A., Buhman K., Siddiqui R. (2011) Migration of MDA-MB-231 breast cancer cells depends on the availability of exogenous lipids and cholesterol esterification. *Clin Exp Metastasis* 28(8):733–741. doi:10.1007/s10585-011-9405-9

123. Comsa S., Cimpean A., Raica M. (2015) The Story of MCF-7 Breast Cancer Cell Line: 40 years of Experience in Research. *Anticancer Research* (35):3147–3154
124. Flavio Bonati, Alfredo Burini, Bianca Rosa Pietroni, Elisabetta Giorgini, Bruna Bovio (1988) Reactions of (tertiary phosphine) gold(I) substituted imidazoles or pyrazolones with acidic reagents: protonation, azole displacement, and adduct formation. Crystal structure determination of the adduct 1-methyl-2- (cyclohexylphosphinegoldthiolato) imidazole/2benzimidazole. *Journal of Organometallic Chemistry* (344):119–135
125. Sánchez-López E., Guerra M., Dias-Ferreira J., Lopez-Machado A., Ettcheto M., Cano A., Espina M., Camins A., Garcia M., Souto E. (2019) Current Applications of Nanoemulsions in Cancer Therapeutics. *Nanomaterials* (Basel) 9(6). doi:10.3390/nano9060821
126. Kankowski S. Synthese, Charakterisierung und biologische Untersuchung verschiedener Phosphan-Gold(I)-Alkin-Verbindungen als mögliche Antitumorwirkstoffe. Masterarbeit, Technische Universität Braunschweig
127. Andre Prause Alkynyl-Gold(I)-Phosphan-Komplexe als mögliche Antitumorwirkstoffe. Synthese, biologische Testung und Strukturwirkungsbeziehungen. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig
128. Ganta S., Talekar M., Singh A., Coleman T., Amiji M. (2014) Nanoemulsions in translational research-opportunities and challenges in targeted cancer therapy. *AAPS PharmSciTech* 15(3):694–708. doi:10.1208/s12249-014-0088-9
129. McClements D. (2012) Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 8(6):1719–1729. doi:10.1039/C2SM06903B
130. Hu C.-M., Zhang L. (2012) Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer. *Biochem Pharmacol* 83(8):1104–1111. doi:10.1016/j.bcp.2012.01.008
131. Meng L., Xia X., Yang Y., Ye J., Dong W., Ma P., Jin Y., Liu Y. (2016) Co-encapsulation of paclitaxel and baicalein in nanoemulsions to overcome multidrug resistance via oxidative stress augmentation and P-glycoprotein inhibition. *Int J Pharm* 513(1-2):8–16. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.09.001
132. Dyllal K., Fægri K. (2007) Introduction to relativistic quantum chemistry. Oxford University Press
133. Versluis L., Ziegler T. (1988) The determination of molecular structures by density functional theory. The evaluation of analytical energy gradients by numerical integration. *The Journal of Chemical Physics* 88(1):322–328. doi:10.1063/1.454603
134. Schmidbaur H., Schier A. (2012) Auophilic interactions as a subject of current research: an up-date. *Chem Soc Rev* 41(1):370–412. doi:10.1039/c1cs15182g
135. Griffiths M., Pallister P., Mandia D., Barry S. (2016) Atomic Layer Deposition of Gold Metal. *Chem. Mater.* 28(1):44–46. doi:10.1021/acs.chemmater.5b04562
136. van Lenthe E., Baerends E., Snijders J. (1994) Relativistic total energy using regular approximations. *The Journal of Chemical Physics* 101(11):9783–9792. doi:10.1063/1.467943
137. Perdew J., Burke K., Wang Y. (1996) Generalized gradient approximation for the exchange-correlation hole of a many-electron system. *Phys. Rev. B* 54(23):16533–16539. doi:10.1103/PhysRevB.54.16533
138. Perdew J., Burke K., Ernzerhof (1996) Generalized Gradient Approximation Made Simple. *Phys Rev Lett* 77(18):3865–3868. doi:10.1103/PhysRevLett.77.3865
139. Boyd D., Lipkowitz K. (2001) Reviews in computational chemistry. Vol. 17. Wiley-VCH

140. Schuster O., Liao R.-Y., Schier A., Schmidbaur H. (2005) Preparation, structure and decomposition of gold(I) and gold(III) acetylide complexes. *Inorganica Chimica Acta* 358(5):1429–1441. doi:10.1016/j.ica.2004.07.005
141. Yam V., Cheung K.-L., Yip S.-K., Cheung K.-K. (2003) Synthesis, characterization, structure and luminescence studies of mono-, di- and trinuclear gold(I) phosphine alkynyl complexes. *Journal of Organometallic Chemistry* 681(1-2):196–209. doi:10.1016/S0022-328X(03)00606-5
142. Vicente J., Chicote M.-T., Abrisqueta M. (1995) Alkynyl gold(I) complexes. The first family of ethynyl gold (I) complexes. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (3):497. doi:10.1039/DT9950000497
143. Chawla A., Kaur R., Goyal A. (2011) Importance of Microwave Reactions in the Synthesis of Novel Benzimidazole Derivatives: A Review. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* 3(6):925–944
144. Das B., Shibata N., Harada K., Toru T. (2007) Synthesis of novel fluorophenylaryl / heteroaryl ether derivatives. *Arkivoc* 2007(16):73. doi:10.3998/ark.5550190.0008.g08
145. Alasmary F., Snelling A., Zain M., Alafeefy A., Awaad A., Karodia N. (2015) Synthesis and Evaluation of Selected Benzimidazole Derivatives as Potential Antimicrobial Agents. *Molecules* 20(8):15206–15223. doi:10.3390/molecules200815206
146. Oehninger L., Spreckelmeyer S., Holenya P., Meier-Menches S., Can S., Alborzinia H., Schur J., Keppler B., Wölfl S., Ott I. (2015) Rhodium(I) N-Heterocyclic Carbene Bioorganometallics as in Vitro Antiproliferative Agents with Distinct Effects on Cellular Signaling. *J Med Chem* 58(24):9591–9600. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01159
147. Phillips M. (1928) CCCXVII.—The formation of 2-substituted benzimidazoles. *J. Chem. Soc.* 0(0):2393–2399. doi:10.1039/JR9280002393
148. Ray L., Katiyar V., Barman S., Raihan M., Nanavati H., Shaikh M., Ghosh P. (2007) Gold(I) N-heterocyclic carbene based initiators for bulk ring-opening polymerization of L-lactide. *Journal of Organometallic Chemistry* 692(20):4259–4269. doi:10.1016/j.jorganchem.2007.06.033
149. Wang H., Lin I. (1998) Facile Synthesis of Silver(I)–Carbene Complexes. Useful Carbene Transfer Agents. *Organometallics* 17(5):972–975. doi:10.1021/om9709704
150. Wang H., Chen C., Lin I. (1999) Synthesis, Structure, and Spectroscopic Properties of Gold(I)–Carbene Complexes. *Organometallics* 18(7):1216–1223. doi:10.1021/om980718b
151. Collado A., Gómez-Suárez A., Martín A., Slawin A., Nolan S. (2013) Straightforward synthesis of Au(NHC)X (NHC = N-heterocyclic carbene, X = Cl, Br, I) complexes. *Chem Commun (Camb)* 49(49):5541–5543. doi:10.1039/c3cc43076f
152. Visbal R., Laguna A., Gimeno M. (2013) Simple and efficient synthesis of MCl(NHC) (M = Au, Ag) complexes. *Chem Commun (Camb)* 49(50):5642–5644. doi:10.1039/c3cc42919a
153. Zhu S., Liang R., Chen L., Wang C., Ren Y., Jiang H. (2012) A direct and practical approach for the synthesis of Au(I)-NHC complexes from commercially available imidazolium salts and Au(III) salts. *Tetrahedron Letters* 53(7):815–818. doi:10.1016/j.tetlet.2011.12.007
154. Frémont P. de, Scott N., Stevens E., Ramnial T., Lightbody O., Macdonald C., Clyburne J., Abernethy C., Nolan S. (2005) Synthesis of Well-Defined N -Heterocyclic Carbene Silver(I) Complexes. *Organometallics* 24(26):6301–6309. doi:10.1021/om050735i
155. Bruce M., Horn E., Matison J., Snow (1984) Chemistry of the Group 1B metals. XVII. Preparation of some gold(I) acetylide complexes containing Group 5 donor ligands: Crystal and molecular structures of Au(C₂C₆F₅)(PPh₃). *Aust. J. Chem.* 37(6):1163. doi:10.1071/CH9841163

156. Cross R., Davidson M. (1986) Preparation and ligand-exchange reactions of phosphinegold ethynyl complexes. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (2):411. doi:10.1039/dt9860000411
157. Brockmann H., Schodder H. (1941) Aluminiumoxyd mit abgestuftem Adsorptionsvermögen zur chromatographischen Adsorption. *Ber. dtsch. Chem. Ges. A/B* 74(1):73–78. doi:10.1002/cber.19410740113
158. Schuh E., Valiahdi S., Jakupec M., Keppler B., Chiba P., Mohr F. (2009) Synthesis and biological studies of some gold(I) complexes containing functionalised alkynes. *Dalton Trans* (48):10841–10845. doi:10.1039/b911234k
159. Gottlieb H., Kotlyar V., Nudelman A. (1997) NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J Org Chem* 62(21):7512–7515. doi:10.1021/jo971176v
160. Friebolin H. (2013) Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie. Eine Einführung, 5. Aufl. Wiley-VCH
161. Pregosin P. (2013) NMR in Organometallic Chemistry. Wiley
162. Gillies R., Didier N., Denton M. (1986) Determination of cell number in monolayer cultures. *Anal Biochem* 159(1):109–113. doi:10.1016/0003-2697(86)90314-3
163. Kueng W., Silber E., Eppenberger U. (1989) Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 182(1):16–19. doi:10.1016/0003-2697(89)90710-0
164. Bernhardt G., Reile H., Birnböck H., Spruss T., Schönenberger H. (1992) Standardized kinetic microassay to quantify differential chemosensitivity on the basis of proliferative activity. *J Cancer Res Clin Oncol* 118(1):35–43. doi:10.1007/BF01192309
165. Laughton C. (1984) Quantification of attached cells in microtiter plates based on Coomassie brilliant blue G-250 staining of total cellular protein. *Anal Biochem* 140(2):417–423. doi:10.1016/0003-2697(84)90187-8
166. Chiba K., Kawakami K., Tohyama K. (1998) Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. *Toxicology in Vitro* 12(3):251–258. doi:10.1016/S0887-2333(97)00107-0
167. Scragg M., Ferreira L. (1991) Evaluation of different staining procedures for the quantification of fibroblasts cultured in 96-well plates. *Anal Biochem* 198(1):80–85. doi:10.1016/0003-2697(91)90509-R
168. Sridharan G., Shankar A. (2012) Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *J Oral Maxillofac Pathol* 16(2):251–255. doi:10.4103/0973-029X.99081
169. Schmidt C. Synthese und bioanalytische Charakterisierung von neuen halogenierten N-heterozyklischen Carben Gold(I) Organometallkomplexen als potentielle Zytostatika und Antibiotika. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
170. Bork S., Pfister S., Witt H., Horn P., Korn B., Ho A., Wagner W. (2010) DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging Cell* 9(1):54–63. doi:10.1111/j.1474-9726.2009.00535.x
171. Schmitz S. (2011) Der Experimentator: Zellkultur. Experimentator. Spektrum Akademischer Verlag
172. Gstraunthaler G., Lindl T. (2013) Zell- und Gewebekultur. Springer Berlin Heidelberg
173. Zellkultur. <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/zellkultur/71584>. Zugegriffen: 27. Februar 2021
174. Kolditz F., Krausze J., Heinz D., Niemann H., Müller-Goymann C. (2014) Wound healing potential of a dimeric InlB variant analyzed by in vitro experiments on re-epithelialization of human skin models. *Eur J Pharm Biopharm* 86(2):277–283. doi:10.1016/j.ejpb.2013.10.003

175. Liang C.-C., Park A., Guan J.-L. (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2(2):329–333. doi:10.1038/nprot.2007.30
176. Dulbecco R., Freeman G. (1959) Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 8(3):396–397. doi:10.1016/0042-6822(59)90043-1
177. Smith K., Borchardt R. (1989) Permeability and mechanism of albumin, cationized albumin, and glycosylated albumin transcellular transport across monolayers of cultured bovine brain capillary endothelial cells. *Pharm Res* 6(6):466–473. doi:10.1023/a:1015960205409
178. Ott I., Scheffler H., Gust R. (2007) Development of a method for the quantification of the molar gold concentration in tumour cells exposed to gold-containing drugs. *ChemMedChem* 2(5):702–707. doi:10.1002/cmdc.200600275
179. Coffey M., Shaw C., Eidsness M., Watkins J., Elder R. (1986) Reactions of auranofin and chloro(triethylphosphine)gold with bovine serum albumin. *Inorg. Chem.* 25(3):333–339. doi:10.1021/ic00223a020
180. Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
181. Hagmann W. (2008) The many roles for fluorine in medicinal chemistry. *J Med Chem* 51(15):4359–4369. doi:10.1021/jm800219f
182. Isanbor C., O'Hagan D. (2006) Fluorine in medicinal chemistry: A review of anti-cancer agents. *Journal of Fluorine Chemistry* 127(3):303–319. doi:10.1016/j.jfluchem.2006.01.011
183. Butcher D. (2013) Molecular absorption spectrometry in flames and furnaces: a review. *Anal Chim Acta* 804:1–15. doi:10.1016/j.aca.2013.07.056
184. Gleisner H., Welz B., Einax J. (2010) Optimization of fluorine determination via the molecular absorption of gallium mono-fluoride in a graphite furnace using a high-resolution continuum source spectrometer. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 65(9-10):864–869. doi:10.1016/j.sab.2010.08.003
185. Heitmann U., Becker-Roß H., Florek S., Huang M., Okrusch M. (2006) Determination of non-metals via molecular absorption using high-resolution continuum source absorption spectrometry and graphite furnace atomization. *J. Anal. At. Spectrom.* 21(11):1314. doi:10.1039/b607384k
186. Saccoccia F., Angelucci F., Boumis G., Carotti D., Desiato G., Miele A., Bellelli A. (2014) Thioredoxin Reductase and its Inhibitors. *CPPS* 15(6):621–646. doi:10.2174/1389203715666140530091910
187. Jakupoglu, Cemile Charakterisierung der Selenoproteine Thioredoxinreduktase 1 und 2 anhand von Knock-out-Mausmodellen
188. Lu J., Holmgren A. (2014) The thioredoxin antioxidant system. *Free Radic Biol Med* 66:75–87. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036
189. Mustacich D., Powis G. (2000) Review Article Thioredoxin Reductase. *Semiotica* 129(1-4):1–8. doi:10.1515/semi.2000.129.1-4.71
190. Argyrou A., Blanchard J. (2004) Flavoprotein Disulfide Reductases: Advances in Chemistry and Function. In: Moldave K (Hrsg) *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, Bd 78, S 89–142. Academic Press
191. Lee Y., Kim S., Lazar P., Moon J., Hwang S., Thangapandian S., Shon Y., Lee K., Lee S., Lee K. (2012) Comparative molecular modeling study of Arabidopsis NADPH-dependent

- thioredoxin reductase and its hybrid protein. PLoS ONE 7(9):e46279. doi:10.1371/journal.pone.0046279
192. Sandalova T., Zhong L., Lindqvist Y., Holmgren A., Schneider G. (2001) Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17):9533–9538. doi:10.1073/pnas.171178698
 193. Fritz-Wolf K., Urig S., Becker K. (2007) The structure of human thioredoxin reductase 1 provides insights into C-terminal rearrangements during catalysis. *J Mol Biol* 370(1):116–127. doi:10.1016/j.jmb.2007.04.044
 194. Arnér E., Holmgren A. (2000) Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European Journal of Biochemistry* 267(20):6102–6109. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01701.x
 195. Fernandes A., Holmgren A. (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal* 6(1):63–74. doi:10.1089/152308604771978354
 196. Lushchak V. (2012) Glutathione homeostasis and functions: potential targets for medical interventions. *J Amino Acids* 2012:736837. doi:10.1155/2012/736837
 197. Penzer G., Radda G. (1967) The chemistry and biological function of isoalloxazines (flavines). *Q. Rev., Chem. Soc.* 21(1):43. doi:10.1039/qr9672100043
 198. Luthman M., Holmgren A. (1982) Rat Liver Thioredoxin and Thioredoxin Reductase: Purification and Characterization. *American Chemical Society* (21 (26)):6628
 199. Zou J., Taylor P., Dornan J., Robinson S., Walkinshaw M., Sadler P. (2000) First Crystal Structure of a Medicinally Relevant Gold Protein Complex: Unexpected Binding of [Au(PET₃)]⁺ to Histidine. *Angew. Chem. Int. Ed.* 39(16):2931–2934. doi:10.1002/1521-3773(20000818)39:16<2931::AID-ANIE2931>3.0.CO;2-W
 200. Lothrop A., Snider G., Ruggles E., Patel A., Lees W., Hondal R. (2014) Selenium as an electron acceptor during the catalytic mechanism of thioredoxin reductase. *Biochemistry* 53(4):654–663. doi:10.1021/bi400658g
 201. Berggren M., Husbeck B., Samulitis B., Baker A., Gallegos A., Powis G. (2001) Thioredoxin peroxidase-1 (peroxiredoxin-1) is increased in thioredoxin-1 transfected cells and results in enhanced protection against apoptosis caused by hydrogen peroxide but not by other agents including dexamethasone, etoposide, and doxorubicin. *Arch Biochem Biophys* 392(1):103–109. doi:10.1006/abbi.2001.2435
 202. Powis G., Montfort W. (2001) Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:261–295. doi:10.1146/annurev.pharmtox.41.1.261
 203. Mahmood D., Abderrazak A., El Hadri K., Simmet T., Rouis M. (2013) The thioredoxin system as a therapeutic target in human health and disease. *Antioxid Redox Signal* 19(11):1266–1303. doi:10.1089/ars.2012.4757
 204. Arnér E., Holmgren A. (2006) The thioredoxin system in cancer. *Semin Cancer Biol* 16(6):420–426. doi:10.1016/j.semcancer.2006.10.009
 205. Nordlund P., Reichard P. (2006) Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* 75:681–706. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142443
 206. Kahlos K., Soini Y., Sily M., Koistinen P., Kakko S., Pkk P., Holmgren A., Kinnula V. (2001) Up-regulation of thioredoxin and thioredoxin reductase in human malignant pleural mesothelioma. *Int. J. Cancer* 95(3):198–204. doi:10.1002/1097-0215(20010520)95:3<198::AID-IJC1034>3.0.CO;2-F

207. Yokomizo A., Ono M., Nanri H., Makino Y., Ohga T., Wada M., Okamoto T., Yodoi J., Kuwano M., Kohno K. (1995) Cellular levels of thioredoxin associated with drug sensitivity to cisplatin, mitomycin C, doxorubicin, and etoposide. *Cancer Res* 55(19):4293–4296
208. Yoo M.-H., Xu X.-M., Carlson B., Gladyshev V., Hatfield D. (2006) Thioredoxin reductase 1 deficiency reverses tumor phenotype and tumorigenicity of lung carcinoma cells. *J Biol Chem* 281(19):13005–13008. doi:10.1074/jbc.C600012200
209. Baker A., Payne C., Briehl M., Powis G. (1997) Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis in vitro and in vivo. *Cancer Res* 57(22):5162–5167
210. Grogan T., Fenoglio-Prieser C., Zeheb R., Bellamy W., Frutiger Y., Vela E., Stemmerman G., Macdonald J., Richter L., Gallegos A., Powis G. (2000) Thioredoxin, a putative oncogene product, is overexpressed in gastric carcinoma and associated with increased proliferation and increased cell survival. *Hum Pathol* 31(4):475–481. doi:10.1053/hp.2000.6546
211. Hashemy S., Ungerstedt J., Zahedi Avval F., Holmgren A. (2006) Motexafin gadolinium, a tumor-selective drug targeting thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* 281(16):10691–10697. doi:10.1074/jbc.M511373200
212. Becker K., Gromer S., Schirmer R., Müller S. (2000) Thioredoxin reductase as a pathophysiological factor and drug target. *European Journal of Biochemistry* 267(20):6118–6125. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01703.x
213. Pratesi A., Gabbiani C., Michelucci E., Ginanneschi M., Papini A., Rubbiani R., Ott I., Messori L. (2014) Insights on the mechanism of thioredoxin reductase inhibition by gold N-heterocyclic carbene compounds using the synthetic linear selenocysteine containing C-terminal peptide hTrxR(488-499): an ESI-MS investigation. *J Inorg Biochem* 136:161–169. doi:10.1016/j.jinorgbio.2014.01.009
214. Schmidt C., Albrecht L., Balasupramaniam S., Misgeld R., Karge B., Brönstrup M., Prokop A., Baumann K., Reichl S., Ott I. (2019) A gold(i) biscarbene complex with improved activity as a TrxR inhibitor and cytotoxic drug: comparative studies with different gold metallodrugs. *Metallomics* 11(3):533–545. doi:10.1039/c8mt00306h
215. Serebryanskaya T., Lyakhov A., Ivashkevich L., Schur J., Frias C., Prokop A., Ott I. (2015) Gold(I) thiotetrazolates as thioredoxin reductase inhibitors and antiproliferative agents. *Dalton Trans* 44(3):1161–1169. doi:10.1039/c4dt03105a
216. Lee S., Kim S., Lee R. (2013) Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance. *Antioxid Redox Signal* 18(10):1165–1207. doi:10.1089/ars.2011.4322
217. Williams C., Arscott L., Müller S., Lennon B., Ludwig M., Wang P., Veine D., Becker K., Schirmer R. (2000) Thioredoxin reductase two modes of catalysis have evolved. *European Journal of Biochemistry* 267(20):6110–6117. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01702.x
218. Zhong L., Arnér E., Holmgren A. (2000) Structure and mechanism of mammalian thioredoxin reductase: the active site is a redox-active selenolthiol/selenenylsulfide formed from the conserved cysteine-selenocysteine sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11):5854–5859. doi:10.1073/pnas.100114897
219. Rackham O., Shearwood A.-M., Thyer R., McNamara E., Davies S., Callus B., Miranda-Vizueté A., Berners-Price S., Cheng Q., Arnér E., Filipovska A. (2011) Substrate and inhibitor specificities differ between human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductases: Implications for development of specific inhibitors. *Free Radic Biol Med* 50(6):689–699. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.015

220. Gasdaska P., Gasdaska J., Cochran S., Powis G. (1995) Cloning and sequencing of a human thioredoxin reductase. *FEBS Letters* 373(1):5–9. doi:10.1016/0014-5793(95)01003-W
221. Montano S., Lu J., Gustafsson T., Holmgren A. (2014) Activity assays of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase: fluorescent disulfide substrates, mechanisms, and use with tissue samples. *Anal Biochem* 449:139–146. doi:10.1016/j.ab.2013.12.025
222. Ott I., Qian X., Xu Y., Vlecken D., Marques I., Kubutat D., Will J., Sheldrick W., Jesse P., Prokop A., Bagowski C. (2009) A gold(I) phosphine complex containing a naphthalimide ligand functions as a TrxR inhibiting antiproliferative agent and angiogenesis inhibitor. *J Med Chem* 52(3):763–770. doi:10.1021/jm8012135
223. Hill, K. E., et al. Determination of Thioredoxin Reductase Activity in Rat Liver Supernatant
224. Zhao R., Masayasu H., Holmgren A. (2002) Ebselen: A substrate for human thioredoxin reductase strongly stimulating its hydroperoxide reductase activity and a superfast thioredoxin oxidant. *pnas* (99 (13)):8579. doi:10.1073/pnas.122061399
225. Rehm H., Letzel T. (2010) *Der Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics*, 6. Aufl. Experimentator. Spektrum Akademischer Verlag
226. Mülhardt C. (2009) *Der Experimentator: Molekularbiologie/ Genomics*, 6. Aufl. Experimentator. Spektrum Akad. Verl.; Springer
227. Fritz-Wolf K., Kehr S., Stumpf M., Rahlfs S., Becker K. (2011) Crystal structure of the human thioredoxin reductase-thioredoxin complex. *Nat Commun* 2:383. doi:10.1038/ncomms1382
228. Di Zhang, Xu Z., Yuan J., Zhao Y.-X., Qiao Z.-Y., Gao Y.-J., Yu G.-A., Li J., Wang H. (2014) Synthesis and molecular recognition studies on small-molecule inhibitors for thioredoxin reductase. *J Med Chem* 57(19):8132–8139. doi:10.1021/jm5012098
229. Shahi Thakuri P., Ham S., Luker G., Tavana H. (2016) Multiparametric Analysis of Oncology Drug Screening with Aqueous Two-Phase Tumor Spheroids. *Mol Pharm* 13(11):3724–3735. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.6b00527
230. Lin Y.-X., Gao Y.-J., Wang Y., Qiao Z.-Y., Fan G., Qiao S.-L., Zhang R.-X., Wang L., Wang H. (2015) pH-Sensitive Polymeric Nanoparticles with Gold(I) Compound Payloads Synergistically Induce Cancer Cell Death through Modulation of Autophagy. *Mol Pharm* 12(8):2869–2878. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.5b00060
231. Rodrigues M., Russo L., Aguiló E., Rodríguez L., Ott I., Pérez-García L. (2016) Au(I) N-heterocyclic carbenes from bis-imidazolium amphiphiles: synthesis, cytotoxicity and incorporation onto gold nanoparticles. *RSC Adv.* 6(3):2202–2209. doi:10.1039/C5RA21621D
232. Sipos G., Drinkel E., Dorta R. (2015) The emergence of sulfoxides as efficient ligands in transition metal catalysis. *Chem Soc Rev* 44(11):3834–3860. doi:10.1039/c4cs00524d
233. Eppendorf AG (2019) *Eppendorf Research Plus - Bedienganleitung*
234. Eppendorf AG (2019) *Standardprüfanweisung für manuelle Dosiergeräte*
235. Perkin Elmer (2010) *VICTORX Multilabel Plate Readers*
236. Pögel F. Leistungsparameter und Qualifizierungskonzepte für die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie anhand von Bindungskinetiken. Dissertation, Technische Universität Braunschweig
237. Oechslein C. *GMP-Kompaktwissen*
238. Zhang J.-J., Zou H., Lei J., He B., He X., Sung H., Kwok R., Lam J., Zheng L., Tang B. (2020) Multifunctional Au(I) -based AIEgens: Manipulating Molecular Structures and Boosting Specific Cancer Cell Imaging and Theranostics. *Angew. Chem. Int. Ed.* 59(18):7097–7105. doi:10.1002/anie.202000048

239. Bazzicalupi C., Ferraroni M., Papi F., Massai L., Bertrand B., Messori L., Gratteri P., Casini A. (2016) Determinants for Tight and Selective Binding of a Medicinal Dicarbene Gold(I) Complex to a Telomeric DNA G-Quadruplex: a Joint ESI MS and XRD Investigation. *Angewandte Chemie* 128(13):4328–4331. doi:10.1002/ange.201511999
240. Estrada-Ortiz N., Guarra F., Graaf I. de, Marchetti L., Jager M. de, Groothuis G., Gabbiani C., Casini A. (2017) Anticancer Gold N-Heterocyclic Carbene Complexes: A Comparative in vitro and ex vivo Study. *ChemMedChem* 12(17):1429–1435. doi:10.1002/cmdc.201700316
241. Lima J., Rodríguez L. (2011) Applications of gold(I) alkynyl systems: a growing field to explore. *Chem Soc Rev* 40(11):5442–5456. doi:10.1039/c1cs15123a
242. Cohen E., Ophir I., Shaul Y. (1999) Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *J Cell Sci* 112 (Pt 16):2657–2666
243. Gelbrich N., Ahrend H., Kaul A., Brandenburg L.-O., Zimmermann U., Mustea A., Burchardt M., Gümbel D., Stope M. (2017) Different Cytokine and Chemokine Expression Patterns in Malignant Compared to Those in Nonmalignant Renal Cells. *Anal Cell Pathol (Amst)* 2017. doi:10.1155/2017/7190546
244. Sedee A., van Beijersbergen Henegouwen G., Vries M. de, Erkelens C. (1985) Mestranol: the assignment of its ¹H and ¹³C NMR spectra by means of two-dimensional NMR spectroscopy, and its photochemical decomposition. *Steroids* 45(2):101–118
245. Ma J., Stoter G., Verweij J., Schellens J. (1996) Comparison of ethanol plasma-protein precipitation with plasma ultrafiltration and trichloroacetic acid protein precipitation for the measurement of unbound platinum concentrations. *Cancer Chemother Pharmacol* 38(4):391–394. doi:10.1007/s002800050501
246. Ellman G. (1958) A colorimetric method for determining low concentrations of mercaptans. *Arch Biochem Biophys* 74(2):443–450
247. Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9(6):255–262. doi:10.1002/elps.1150090603
248. Renart J., Reiser J., Stark G. (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (79 (7)):3116
249. Abiturjahrgang 2006 (2006), Abschlussbuch: Cabisino. Mehr Verstand als Glück, Pelizaeus Gymnasium Paderborn

Lebenslauf

Name: Agnieszka Varchmin, geb. Próchnicka
Geboren am: 17.03.1986
Geboren in: Gdynia (Gdingen, Polen)

Ausbildung und beruflicher Werdegang

1993 - 1997	Fritz-Reuter-Schule, Bremerhaven
1997 - 1999	Immanuel-Kant-Schule, Bremerhaven
1999 - 2006	Abitur , Pelizaeus-Gymnasium, Paderborn
2006 - 2011	Pharmaziestudium an der Technischen Universität Braunschweig
2009	1. Staatsexamen , TU BS
2011	2. Staatsexamen , TU BS
2011	Erste Hälfte des praktischen Jahres am Institut für Pharmazeutische Biologie der Technischen Universität Braunschweig (Mai bis Oktober 2011)
2012	Zweite Hälfte des praktischen Jahres in der Süd-Apotheke, Paderborn (November 2011 bis April 2012)
13.06.2012	3. Staatsexamen , Apothekerkammer Niedersachsen
18.06.2012 - 17.06.2013	Angestellte Apothekerin in der Süd-Apotheke, Paderborn
01.08.2013 - 31.10.2017	wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis von Prof. Ott am Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie
21.10.2016	Prüfung zur Fachapothekerin für Pharmazeutische Analytik
01.11.2017 - 31.01.2019	Angestellte Apothekerin in der Apotheke am Bienroder Weg, Braunschweig
01.10.2013 - 31.10.2019	Apothekervertretung und Versorgung der Substitutionspatienten in der Roland-Apotheke, Braunschweig
15.11.2013 - 31.12.2019	Notdienste und Vertretung in der Apotheke am Botanischen Garten, Braunschweig
Seit 01.12.2019	Angestellte Apothekerin in der Brücken Apotheke, Wernigerode
01.08.2013 - 01.07.2021	Promotion (Dr. rer. nat) Technische Universität Braunschweig, Institut für Medizinische und Pharmazeutische Chemie, Arbeitskreis Prof. Dr. Ingo Ott

Wissenschaftliche Publikationen

Skiba J., Kowalski K., Prochnicka A., Ott I., Solecka J., Rajnisz A., Therrien B., Metallocene-uracil conjugates: synthesis and biological evaluation of novel mono-, di- and tri-nuclear systems. *J. Organomet. Chem.*, (2015), 782, 52-61

Walther W., Dada O., Ott I., Prochnicka A., Büttner B., Zhu X., Tacke M., In vivo investigations into the carbene gold anticancer drug candidates NHC*-Au-SCN and NHC*-Au-Scyclo. *Trends Cancer Res.* (2018), 13, 63-70

Gold Metallodrugs to Target Coronavirus Proteins: Inhibitory Effects on the Spike-ACE2 Interaction and on PLpro Protease Activity by Auranofin and Gold Organometallics (Publikation), Gil-Moles, M., Basu, U., Büssing, R., Hoffmeister, H., Türck, S., Varchmin, A., Ott I., *Chemistry - A European Journal* (2020)

Wissenschaftliche Tagungsbeiträge

Synthesis and Biological Studies of New Alkynylgold(I)-NHC-complexes as Anticancer Agents (Poster), Prochnicka, A., Ott, I., Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), 2014, Frankfurt

Gold(I)-Verbindungen mit NHC- und Alkinliganden als neue Antitumorwirkstoffe (Poster), Prochnicka, A., Ott, I., Projekttreffen - Neuartige Synthese- und Formulierungsverfahren für schwerlösliche Arzneistoffe und empfindliche Biopharmazeutika (SynFoBiA) 2015, Braunschweig

New Alkynyl Gold(I) NHC Complexes Differ in Their NHC Core Show Interesting Anticancer Activity (Poster), Prochnicka, A., Munoz Castro, A., Ott, I., 13th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry (ISABC), 2015, Galway

Gold(I) in Combination with NHC, Phosphane and Alkyne Ligands shows Promising Anticancer Properties - An Overview (Poster), Prochnicka, A., Andermark, V., Kankowski, S., Meyer, A., Rubbiani, R., Göke, K., Bunjes, H., Ott, I., Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft (DPhG), 2015, Düsseldorf

Development of Alkynyl-Gold(I) Complexes as New Anticancer Agents - Synthesis, Chemical Properties and First Biological Evaluation (Poster und Kurzvortrag), Prochnicka, A., Andermark, V., Kankowski, S., Ott, I., Symposium on Pharmaceutical Engineering Research (SPhERe), 2015, Braunschweig

Entwicklung, biologische Untersuchung und Targetidentifizierung von Alkynylgold(I)-Komplexen als potentielle Zytostatika (Vortrag), Prochnicka, A., Ott, I., Projekttreffen - Neuartige Synthese- und Formulierungsverfahren für schwerlösliche Arzneistoffe und empfindliche Biopharmazeutika (SynFoBiA), 2015, Braunschweig

Entwicklung, biologische Untersuchung und Targetidentifizierung von Alkynylgold(I)-Komplexen als potentielle Zytostatika (Poster), Prochnicka, A., Ott, I., Projekttreffen - Neuartige Synthese- und Formulierungsverfahren für schwerlösliche Arzneistoffe und empfindliche Biopharmazeutika (SynFoBiA), 2016, Braunschweig

Cluster 1 - Chemical Synthesis and Downstreaming Processes (Workshopbeitrag) - Agnieszka Prochnicka, Jessica Wölker, Rosanna Meine, Tobias Sauk, Marius Meise, Moritz Rehbein, Victor Emenike, Xiangzhong Xie, Andreas Mecklenfeld, μ -Props, 30.03.2016, St. Andreasberg

Gold(I)-Alkynyl Complexes Establish as Possible Anticancer Agents (Poster), Prochnicka, A., Andermark, V., Kankowski, S., Munoz Castro, A., Ott, I., 13th European Biological Inorganic Chemistry Conference (EuroBIC), 2016, Budapest

Phosphan-Au(I)-Alkine - Syntheseoptimierung, Formulierungsversuche (Vortrag), Prochnicka, A., Projekttreffen - Neuartige Synthese- und Formulierungsverfahren für schwerlösliche Arzneistoffe und empfindliche Biopharmazeutika (SynFoBiA), 2016, Braunschweig

Synthese und biologische Untersuchung von neuen Gold(I)-Alkinen als potentielle Zytostatika (Vortrag), Prochnicka, A., Pharmazieseminar WS 16/17, 2017, Braunschweig